

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE (Ph.D.)

PAR

ABDERRAHIM TAZI

Structure des films Langmuir-Blodgett du
cytochrome *f*, du mélange MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f*
par la microscopie à champ proche

Décembre 1996

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Je dédie cette thèse à mes parents, à mes beaux parents, à
ma femme et mon fils, à mon frère et
mes soeurs, pour leur support, leur patience
et leur encouragement continuel
tout au long de mes études.

RÉSUMÉ

Les propriétés interfaciales et structurales du cyt *f*, du mélange MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f* sont étudiées en employant le modèle de monocouche à l'interface air/eau et des films Langmuir-Blodgett (L-B) sur substrat solide.

L'étude concernant l'effet de la concentration interfaciale du cyt *f*, du solvant d'étalement et du pH de la sous-phase montre une instabilité des isothermes Π -A et ΔV -A. L'augmentation progressive et simultanée de l'aire moléculaire et de la pression est due à l'organisation et la conformation de la protéine à l'interface air/eau. L'étude des systèmes MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f* à l'interface air/eau montre l'absence de miscibilité et d'interaction entre les deux constituants. Ces derniers sont capables de soutenir une pression de surface de 26 mN/m, comparable à celle rapportée pour la membrane biologique, soit 20 à 30 mN/m.

À l'aide de la microscopie à champ proche SPM (microscope à effet tunnel et à force atomique), nous avons étudié la structure des films L-B de cyt *f* et des mélanges MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f*. Cette technique nous a permis de déterminer l'état physique de la monocouche, l'homogénéité, la structure des différentes phases rencontrées au cours de la compression, ainsi que la présence éventuelle de domaines, d'agrégats et de défauts.

Dans le cas des films préparés à 20% d'éthanol, les images AFM du cyt *f* déposé sur le mica montrent une structure agrégée, compacte et stable. L'effet de la pression interfaciale sur la structure des films n'affecte pas la forme et la taille des agrégats formés (50 nm). Ceci suggère que l'agrégation de la protéine s'effectue à l'interface air/eau. Les agrégats observés dans la structure des films déposés sur le mica, préparés à 80% d'éthanol, forment des domaines ayant une largeur de l'ordre de 100 nm. Dans le cas des films déposés sur l'Au(111)/C₂₀, la taille moyenne des agrégats déterminés par STM varie entre 200 et 400 nm. La différence de taille entre les agrégats observés par AFM et par STM est due à l'effet du substrat, de l'épaisseur du film ainsi qu'à la forme et les dimensions de la pointe.

Les images STM du mélange MGDG/cyt *f* montrent que les agrégats de cyt *f* ont une forme conique alors que dans le mélange DGDG/cyt *f*, les agrégats prennent la forme de cône tronqué. La topographie des films L-B des systèmes en mélange, visualisée par STM et AFM, montre que les deux constituants forment des phases séparées. Ceci confirme la non miscibilité des constituants à l'interface air/eau. Les aires moléculaires du cyt *f* déterminées à partir des images STM sont égales à 19.6 nm² dans le cas du système MGDG/cyt *f* et 7 nm² pour le système DGDG/cyt *f*. L'étude de ces systèmes, nous a permis d'obtenir des images de haute résolution qui décrivent bien la forme globulaire du cyt *f*.

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr Roger M. Leblanc, Professeur et directeur au département de Chimie de l'Université de Miami, pour son attention, sa grande disponibilité, sa compréhension ainsi que pour son support inestimable tout au long de la réalisation de ce projet.

Je désire remercier mon co-directeur, le Dr Pierre F. Blanchet, Professeur au département de Chimie-Biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières (U.Q.T.R), pour sa compréhension, son dévouement et son support exceptionnel.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr Gaétan. Munger et Mme Johanne. Harnois de l'Université du Québec à Trois-Rivières, au Dr J.A. DeRose de l'Institut de Technologie de Californie et au Dr Nanjang Tao, Professeur au département de physique de la Florida International University (FIU) pour toute l'aide qu'ils m'ont accordée pour l'avancement de ce travail.

Je désire témoigner ma reconnaissance au personnel du département de Chimie-Biologie de l'U.Q.T.R et au corps administratif du département de Chimie de l'Université de Miami.

Je tiens aussi à remercier tous ceux et celles qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire et dont l'aide au laboratoire m'a été précieuse, plus précisément Salah Boussaad.

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

A:	Aire moléculaire
Ab:	Surface occupée par les molécules transférées
A _{eff} :	Section efficace traversée par le courant tunnel
A _f :	Surface immergée du substrat au cours du transfert
AFM:	Microscope à force atomique
C ₂₀ :	Acide arachidique
Chl a:	Chlorophylle a
Chl b:	Chlorophylle b
cyt b ₆ / <i>f</i> :	Cytochrome b ₆ / <i>f</i>
cyt b:	Cytochrome b
cyt c:	Cytochrome c
cyt <i>f</i> :	Cytochrome <i>f</i>
d:	Tension superficielle du film monomoléculaire
DGDG:	Digalactosyldiacylglycérol
d ₀ :	Tension superficielle de la sous-phase
ΔV-A:	Isotherme de potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire
ΔV:	Potentiel de surface
e:	Charge de l'électron
F:	Force d'interaction entre la pointe AFM et la surface de l'échantillon

ϕ :	Fonction de travail moyenne des deux métaux
F_A :	Force au poin A
F_B :	Force au poin B
F_C :	Force au poin C
F_D :	Force au poin D
ϕ_p :	Fonction de travail de la pointe
ϕ_s :	Fonction de travail de la surface de l'échantillon
F_z :	Résultante des forces attractives et répulsives
h :	Constante de Planck
HOPG:	Graphite pyrolitique hautement orienté
I_t :	Courant tunnel
J :	Densité du courant tunnel
L-B:	Langmuir-Blodgett
LC:	Liquide condensé
LE:	Liquide Expansé
μ_{\perp} :	Moment dipolaire moyen perpendiculaire à l'interface
m_e :	Masse de l'électron
MGDG:	Monogalactosyldiacylglycérol
N:	Fraction molaire
NADP:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OM:	Microscope optique
Π -A:	Isotherme de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire
Π :	Pression de surface
PC:	Plastocyanine
Π_c :	Pression de surface au collapse
PG:	Phosphatidylglycérol

PQ:	Plastoquinone
PS I:	Photosystème I
PS II:	Photosystème II
QA:	Quinone A
QB:	Quinone B
S:	Distance entre la pointe et l'échantillon
SEM:	Microscope électronique à balayage
SPM:	Microscope à champ proche
SQDG:	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
S _r :	Vitesse de balayage
STM:	Microscope à effet tunnel
S _z :	Taille de l'image
T:	Rendement de la déposition
TEM:	Microscope électronique à transmission
UHV:	Vide ultra poussé
V:	Tension appliquée entre la pointe et l'échantillon
V _b :	Tension électrique appliquée entre la pointe tunnel et l'échantillon
V _m :	Différence de potentiel en présence de la monocouche
V ₀ :	Différence de potentiel en absence de la monocouche
X:	Abscisse de la pointe
Y:	Ordonné de la pointe
Z _r :	Distance de séparation entre la pointe AFM et la surface de l'échantillon

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	Viii
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES.....	Xvi
 CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1. Structure du chloroplaste.....	1
1.2. Le transfert et la migration d'énergie à travers la membrane photosynthétique.....	2
1.3. Les constituants de la membrane photosynthétique.....	5
1.3.1. Les chlorophylles.....	5
1.3.2. Les lipides.....	7
1.3.2.1. Composition lipidique de la membrane du thylacoïde.....	7
1.3.2.2. Le rôle des principaux lipides de la membrane du thylacoïde.....	8

1.3.3. Les caroténoïdes.....	12
1.3.4. Les protéines.....	12
1.3.4.1. Le complexe du cytochrome b_6/f	12
1.3.4.2. Le cytochrome f	16
1.3.4.3. La composition en acide aminé du cytochrome f	18
1.4. Les modèles membranaires.....	21
1.4.1. Les bicouches.....	22
1.4.2. Les films monomoléculaires.....	25
1.5. Étude des protéines à l'interface air/eau.....	26
1.5.1. Épandage d'une protéine à l'interface air/eau.....	26
1.5.2. Influence de certains paramètres sur la stabilité de la monocouche.....	27
1.6. Études des films mixtes à l'interface air/eau.....	28
1.7. Étude des interactions lipide-protéine par la technique des monocouches.....	31
1.8. Étude de la structure des films L-B par la microscopie à champ proche (SPM: Scanning Probe Microscopy).....	37
1.9. But de notre travail.....	41

CHAPITRE 2: DESCRIPTION DE LA MICROSCOPIE À CHAMP PROCHE: LA MICROSCOPIE À EFFET TUNNEL ET À FORCE ATOMIQUE.....	44
2.1. Microscopie à effet tunnel.....	44
2.1.1. Principe de base de la microscopie à effet tunnel.....	44
2.1.2. Mode d'opération du microscope à effet tunnel.....	46
2.1.3. La pointe STM.....	48
2.1.3.1. Technique de préparation de la pointe.....	48
2.1.3.2. Fonctionnement de la pointe.....	50
2.2. Microscopie à force atomique.....	51
2.2.1. Principe de base de la microscopie à force atomique.....	51
2.2.2. Mode d'opération de l'AFM.....	56
2.2.2.1. Type de force entre la pointe et l'échantillon.....	56
2.2.2.2. Mode contact et non contact.....	59
2.3. Types de substrats utilisés pour l'STM et l'AFM.....	61
CHAPITRE 3: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	63
3.1. Matériels.....	63
3.1.1. Pureté des produits utilisés.....	63

3.1.2. Purification de l'eau et des sels de la sous-phase.....	63
3.1.3. Pureté des molécules utilisées en monocouche.....	65
3.1.4. Les solvants d'étalement.....	67
3.2. Méthodes.....	67
3.2.1. Technique de fabrication de la monocouche à l'interface air/eau.....	67
3.2.2. Préparation des films mixtes.....	68
3.2.3. La cuve "bain de Langmuir".....	70
3.2.4. Mesure de la pression de surface.....	72
3.2.4.1. Méthode de Wilhelmy.....	72
3.2.4.2. Méthode de Langmuir.....	73
3.2.5. Le potentiel de surface.....	73
3.2.6. L'isotherme de pression de surface (Π -A).....	75
3.3. Les films de Langmuir-Blodgett (L-B).....	77
3.3.1. Le transfert sur substrat solide.....	77
3.3.2. Les différents types de transfert.....	80

CHAPITRE 4: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	83
4.1. Caractérisation des isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i> à l'interface air/eau.....	83
4.1.1. Effet de la concentration interfaciale du cyt <i>f</i> sur les isothermes Π -A et ΔV -A.....	83
4.1.2. Effet du solvant d'étalement sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i>	87
4.1.3. Effet du pH de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i>	90
4.1.4. Conclusion.....	93
4.2. Étude de la structure des films L-B du cyt <i>f</i> par AFM.....	95
4.2.1. Effet de la pression interfaciale sur la structure des films L-B du cyt <i>f</i> préparés à 20% d'éthanol.....	95
4.2.1.1. Préparation d'une monocouche de cyt <i>f</i> déposée sur le mica.....	95
4.2.1.2. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 5 mN/m sur le mica.....	96
4.2.1.3. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 10 mN/m sur le mica.....	99
4.2.1.4. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 15 mN/m sur le mica.....	101
4.2.2. Effet de la pression interfaciale sur la structure des films L-B du cyt <i>f</i> préparés à 80% d'éthanol.....	103

4.2.2.1. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 5 mN/m sur le mica.....	103
4.2.2.2. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 10 mN/m sur le mica.....	105
4.2.2.3. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 15 mN/m sur le mica.....	107
4.2.2.4. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt <i>f</i> transférée à 20 mN/m sur le mica.....	109
4.2.3. Effet du substrat sur la structure des films L-B de cyt <i>f</i>	111
4.2.3.1. Isotherme Π -A de l'acide arachidique (C ₂₀).....	112
4.2.3.2. Le substrat modifié.....	112
4.2.3.3. Visualisation par STM du substrat modifié [Au(111)/C ₂₀].....	114
4.2.3.4. Visualisation par STM du cyt <i>f</i> déposé sur l'Au(111)/C ₂₀	117
4.2.4. Conclusion.....	119
4.3. Étude de la structure des films L-B du cyt <i>f</i> incorporé dans une monocouche lipidique.....	121
4.3.1. Structure des films L-B du mélange MGDG/cyt <i>f</i>	122
4.3.1.1. Propriétés interfaciales du MGDG et du mélange MGDG/cyt <i>f</i>	122

4.3.1.2. Visualisation par STM du mélange MGDG/cyt <i>f</i> en film L-B.....	125
4.3.1.3. Visualisation par AFM du mélange MGDG/cyt <i>f</i> en film L-B.....	130
4.3.1.4. Topographie du mélange MGDG/cyt <i>f</i> en film L-B déposé sur le mica modifié (mica/C ₂₀).....	134
4.3.2. Étude de la structure du cyt <i>f</i> incorporé dans une monocouche lipidique de DGDG.....	139
4.3.2.1. Propriétés interfaciales du DGDG et du mélange DGDG/cyt <i>f</i>	139
4.3.2.2. Visualisation par STM du mélange DGDG/cyt <i>f</i> en film L-B.....	141
4.3.2.3. Visualisation par STM des particules de cyt <i>f</i> à une échelle moléculaire.....	146
4.3.3. Conclusion.....	149
5. CONCLUSION.....	152
6. RÉFÉRENCES.....	154

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
1. Distribution en pourcentage des principaux lipides des membranes des thylacoïdes provenant de différentes espèces de plantes.....	10
2. pourcentage en poids de protéines et de lipides de diverses membranes cellulaires.....	24
3. Type de forces existant entre la pointe et l'échantillon.....	60

LISTE DES FIGURES

	PAGE
1. Représentation schématique de la membrane photosynthétique.....	3
2. Le schéma en Z de la photosynthèse.....	4
3. Structure de la molécule de Chlorophylle a.....	6
4. Structure des principaux lipides de la membrane du thylacoïde.....	9
5. Le transport cyclique d'électrons dans le complexe b_6/f	13
6. Modèle de l'organisation topographique des quatre sous-unités individuelles du complexes b_6/f	15
7. Spectre d'absorption du cyt f	17
8. Modèle de la topographie du cyt f dans la bicouche lipidique membranaire.....	19
9. Évolution de la pression de surface au collapse selon la miscibilité des composés.....	30
10. Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope à effet tunnel (STM).....	47
11. Vue de la pointe STM prise par microscopie électronique à balayage (SEM).....	49

12. Schéma du principe de fonctionnement du microscope à force atomique (AFM).....	52
13. Image de la pointe AFM prise par microscopie électronique à transmission (TEM).....	53
14. Représentation schématique de fonctionnement du système de détection par déviation optique.....	55
15. Courbe typique de la force agissant sur le micro-levier en fonction de la distance séparant la pointe et l'échantillon.....	57
16. Densitogramme électrophorétique représentant l'isolation du cyt <i>f</i> sur gel de polyacrylamide. (a): Représente l'isolation du cyt <i>f</i> . (b): Représente la migration du standard.....	66
17. Représentation schématique de la procédure expérimentale pour préparer les films mixtes lipide-protéine (A) et de la correspondance avec les isothermes Π -A (B).....	69
18. Représentation schématique de la cuve de Langmuir servant à mesurer les isothermes Π -A et ΔV -A.....	71
19. Isotherme Π -A d'une substance amphiphile, montrant les différents états de phase de la monocouche au cours de la compression.....	76
20. Séquence de déposition des monocouches.....	78
21. Les différents types de transfert sur substrat solide.....	81
22. Effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt <i>f</i> . Les quantités déposées sont indiquées dans la figure. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.....	84

23. Effet du solvant d'étalement sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. La protéine (40 μ g) est déposée à la surface de la sous-phase à partir d'une solution constituée d'éthanol/eau. Les pourcentages d'éthanol utilisés pour la déposition du cyt *f* sont indiqués dans la figure.
Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.....88
24. Effet du pH de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les pH de la sous-phase utilisés dans ce cas sont indiqués dans la figure.
Sous-phase: Tris-HCl 1 mM.....92
25. Image AFM de la surface du mica. La taille de l'image est égale à 50 x 50 nm (voir détails dans le texte).....97
26. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 5 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 2 x 2 μ m et 1 x 1 μ m, respectivement.....98
27. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 10 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 3.5 x 3.5 μ m et 1.75 x 1.75 μ m, respectivement.....100
28. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 15 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 2.5 x 2.5 μ m et 1.25 x 1.25 μ m, respectivement.....102

29. Images AFM d'une monocouche de cyt f en film L-B transférée à 5 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt f (40 μg) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 6 x 6 μm et 2 x 2 μm , respectivement.....104
30. Images AFM d'une monocouche de cyt f en film L-B transférée à 10 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt f (40 μg) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm et 2 x 2 μm , respectivement.....106
31. Images AFM d'une monocouche de cyt f en film L-B transférée à 15 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt f (40 μg) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm et 2 x 2 μm , respectivement.....108
32. Images AFM d'une monocouche de cyt f en film L-B transférée à 20 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt f (40 μg) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 2 x 2 μm et 1 x 1 μm , respectivement.....110
33. Isotherme Π -A de l'acide arachidique (C_{20}). La monocouche de C_{20} est préparée à partir d'une solution de chloroforme (0.3 mg/ml). Sous-phase: eau pure, pH: 5.6.....113

34. (a): Image STM de la surface d'Au(111) déposé sur le mica.
 (b): Image STM de 3 monocouches de C₂₀ déposées à 30 mN/m sur l'Au(111). Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 6 x 6 μm et 4 x 4 μm , respectivement.....115
35. Images STM d'une bicouche de cyt *f* en film L-B préparée à 20% d'éthanol. La bicouche est transférée sur l'Au(111)/C₂₀ à une pression de surface égale à 15 mN/m. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 6 x 6 μm et 3 x 3 μm , respectivement.....118
36. Isotherme Π -A du MGDG et du mélange MGDG/cyt *f*.
 La monocouche de MGDG est préparée à partir d'une solution constituée de chloroforme:méthanol (9:1, v:v) à une concentration de 0.25 mg/ml. Le cyt *f* est incorporé à la monocouche lipidique par épandage d'une solution préparée à 20% d'éthanol, la fraction molaire de cyt *f* est de 5%. La vitesse de compression est de 4 Å² molécule⁻¹s⁻¹.
 Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.....124
37. Images STM de la structure du film L-B du mélange MGDG/cyt *f* déposé sur l'Au(111). Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm et 1 x 1 μm , respectivement.....126
38. (a): Image STM de la morphologie d'un seul domaine triangulaire formé dans le mélange MGDG/cyt *f* déposé sur l'Au(111). (b): Une vue rapprochée, par AFM, de la paire de cônes. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 165 x 165 nm et 66 x 66 nm, respectivement.....128
39. Courbe de profil des particules de cyt *f*. La ligne discontinue tracée dans l'image 36.b correspond au tracé de ce profil.....129

40. Vue en 3 dimensions de la paire des agrégats de
cyt *f* observée dans l'image (b) de la figure 38,
présentée en haut.....131

41. (a): Image AFM de la topographie de la surface du film
L-B du mélange MGDG/cyt *f* déposé sur l'Au(111).
(b): Une vue rapprochée, par AFM, de la paire de cônes.
Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm
et 0.5 x 0.5 μm , respectivement.....132

42. Image AFM de la structure surfacique de C₂₀ déposé sur
le mica. La taille de l'image est égale à 50 x 50 nm
(voir détails dans le texte).....135

43. Image AFM de la topographie du mélange MGDG/cyt *f*
en film L-B déposé sur le mica modifié (mica/C₂₀).
La taille de l'image est de 4 x 4 μm136

44. Courbe du profil de l'agrégat de cyt *f* et du domaine formé
dans la bicouche lipidique. La ligne discontinue tracée
dans l'image 43 correspond au tracé de ce profil.....138

45. Isotherme Π -A du DGDG et du mélange DGDG/cyt *f*. La
monocouche de DGDG est préparée à partir d'une solution
constituée de chloroforme:méthanol (9:1, v:v) à une
concentration de 0.25 mg/ml. Le cyt *f* est incorporé
à la monocouche lipidique par épandage d'une solution
préparée à 20% d'éthanol, la fraction molaire de cyt *f* est
de 5%. La vitesse de compression est de 4 Å² molécule⁻¹ s⁻¹.
Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.....140

46. (a): Image STM de la topographie du mélange DGDG/cyt *f* en
film L-B déposé sur l'Au(111). (b): morphologie d'un seul
domaine formé dans le mélange DGDG/cyt *f*. Les tailles
des images (a) et (b) sont égales à 2 x 2 μm
et 125 x 125 nm, respectivement.....142

47. Courbe de profil de la sphère rugueuse. La ligne
discontinue tracée dans l'image 46.b correspond
au tracé de ce profil.....144
48. Vue en trois dimensions de la sphère rugueuse observée
dans l'image (b) de la figure 46, présentée en haut.....145
49. (a): Image STM des particules de cyt *f* à une échelle
moléculaire. La taille de l'image est de 14 x 14 nm.
(b): Vue en trois dimensions des particules de cyt *f*.....147
50. Courbe de profil des particules de cyt *f*. La ligne
discontinue tracée dans l'image 49.a correspond
au tracé de ce profil.....148

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Structure du chloroplaste

L'appareil photosynthétique des plantes vertes et des algues se localise dans une organelle appelé chloroplaste. Ce dernier est le siège de la photosynthèse. Le chloroplaste possède habituellement une forme globulaire ou discoïde. Sa taille varie de un à dix micromètres de diamètre. Sa structure se compose d'une membrane externe, d'une membrane interne et du stroma. La membrane interne est constituée d'une bicouche lipidique et de protéines transmembranaires. Dans le compartiment du stroma, on trouve le système membranaire tridimensionnel, appelé thylacoïdes. Ces derniers sont empilés transversalement dans le chloroplaste. Ces empilements sont appelés grana. Il existe de nombreux grana par chloroplaste, chaque granum est relié à un autre granum par une lamelle intergranaire. Les granas contiennent tous les enzymes et pigments nécessaires aux réactions primaires de la photosynthèse.

1.2. Le transfert et la migration d'énergie à travers la membrane photosynthétique

Le rôle principal des pigments photosynthétiques est d'absorber l'énergie électromagnétique et de l'acheminer vers les centres réactionnels des photosystèmes. À chaque photosystème est associé un accepteur et un donneur d'électrons ayant des potentiels redox différents. Le photosystème II (figure 1) est formé d'une "paire spéciale" de pigments chlorophylliens (donneur primaire d'électrons), d'un composé Z (donneur secondaire d'électrons) qui réduit la chlorophylle de la "paire spéciale", d'une phéophytine (accepteur primaire) qui accepte l'électron provenant de la chlorophylle, de la quinone Q_A qui accepte l'électron de la phéophytine, et de la quinone Q_B qui accepte l'électron de Q_A (Murata et Miyao, 1989). Grâce à leurs connections au système de transport d'électrons (le cytochrome b , le cytochrome f et la plastocyanine), le transfert d'électrons s'ensuit vers le P700 (PSI) et on aboutit finalement à la synthèse du NADPH. Cela donne aux pigments et aux enzymes du thylacoïde la capacité de convertir l'énergie lumineuse, captée par les antennes collectrices, en énergie chimique nécessaire à la réduction du gaz carbonique.

Les processus chimiques dans lesquels les électrons sont transportés d'une molécule à une autre, entre les deux photosystèmes, sont appelés réactions d'oxydo-réduction. L'ensemble de ces réactions est représenté dans le schéma en Z donné à la figure 2.

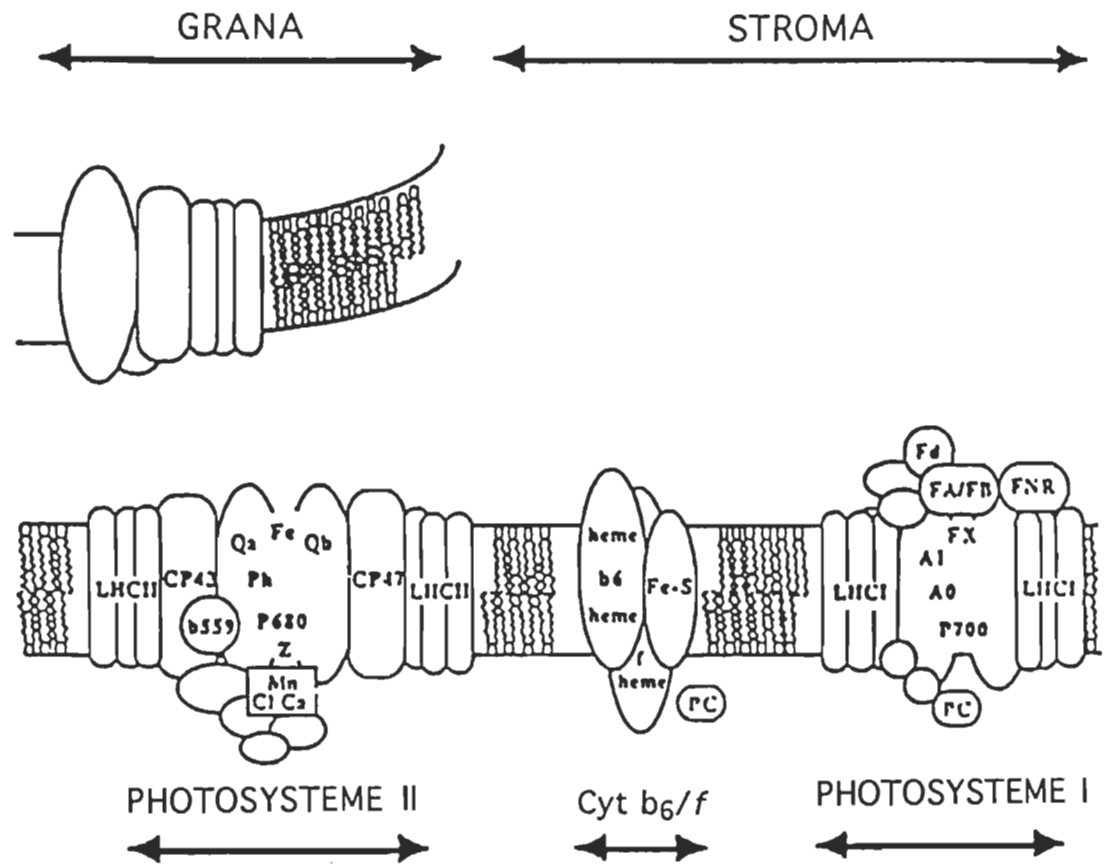


Figure 1. Représentation schématique de la membrane photosynthétique (Tiré de Golbeck, 1987).

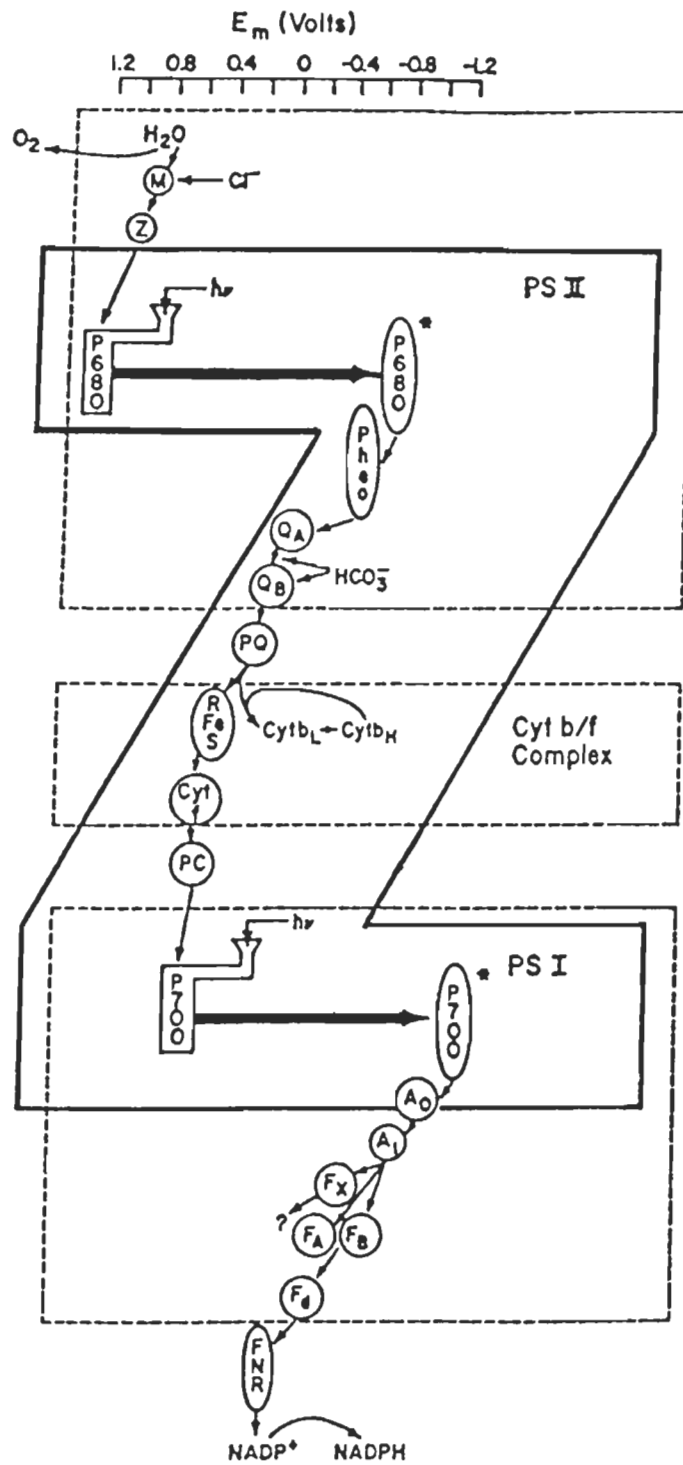


Figure 2. Le schéma en Z de la photosynthèse (Tiré de Govindjee, 1975).

1.3. Les constituants de la membrane photosynthétique

1.3.1. Les chlorophylles

Les cellules photosynthétiques produisant de l'oxygène (les plantes supérieures et les algues vertes) contiennent deux sortes de chlorophylles: la chl a et la chl b. Ces molécules sont solubles dans les solvants organiques et représentent 20 à 30% du poids des lipides dans les thylacoïdes (Hooper, 1984; Murphy, 1986). La majorité des chlorophylles sont associées à des polypeptides spécifiques, et forment des complexes appelés pigments-protéines (Thornber *et al.*, 1979; Thornber *et al.*, 1987).

La chl a est formée d'un noyau porphyrinique polaire et d'une chaîne hydrophobe, le phytol. La porphyrine contient des noyaux appelés pyrroles. Ces noyaux sont disposés en une structure macrocyclique dans laquelle les quatre atomes d'azote centraux sont coordonnés au magnésium (Mg) pour former une structure extrêmement stable, située dans un seul plan. Le phytol est une longue chaîne latérale hydrophobe terpénoïde formée d'un alcool (figure 3). Cette chaîne correspond à la deuxième partie de la molécule, très flexible et lipophile, partie qui peut entrer en interaction avec des entités moléculaires qui lui ressemblent, c'est-à-dire des chaînes d'acides gras, et d'autres pigments comme les caroténoïdes et les chaînes des quinones (Thornber *et al.*, 1987). Ces derniers semblent jouer un rôle dans le mécanisme de la photoréception. Le phytol a surtout comme fonction l'insertion du

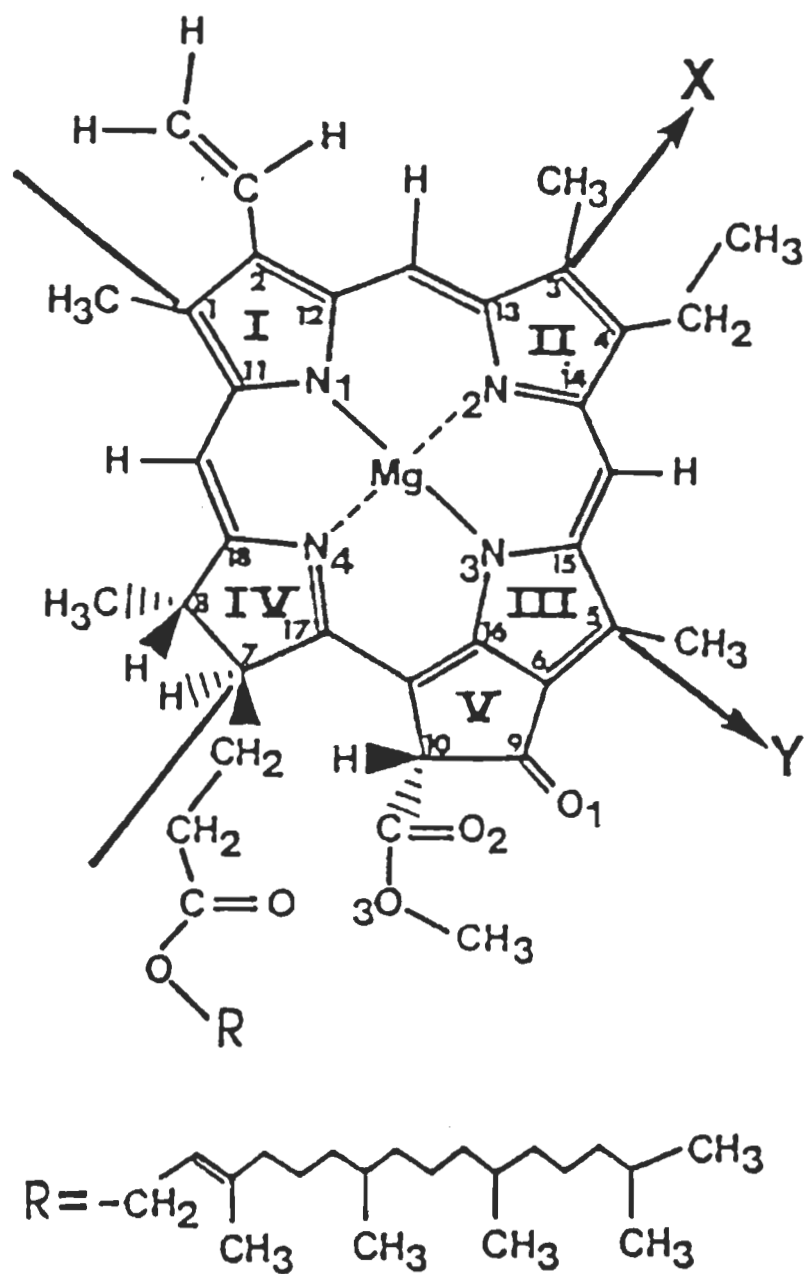


Figure 3. Structure de la molécule de Chlorophylle a (Tiré de Fragata *et al.*, 1988).

photorécepteur dans la membrane photosynthétique. La partie polyénique du cycle tétrapyrrolique est au contraire le siège des échanges d'énergie entre photons et molécules: l'absorption des photons s'y traduit par l'apparition de différents états excités de la chlorophylle.

La chlorophylle a est l'un des pigments clé servant à capturer et à canaliser l'énergie lumineuse vers les centres réactionnels photosynthétiques. Tel que souligné précédemment, il apparaît que la majorité de ces pigments est complexée à des protéines (Brecht, 1986). Nous savons que les partenaires réels de la chlorophylle sont des protéines transmembranaires fortement hydrophobes, cependant nous ne connaissons pas l'importance de leur interaction avec la chlorophylle.

1.3.2. Les lipides

1.3.2.1. Composition lipidique de la membrane du thylacoïde

Les plantes supérieures et les algues contiennent non seulement de la chlorophylle mais aussi des protéines et des lipides organisés en bicouche. La majorité des lipides de la membrane photosynthétique sont des galactolipides. Parmi ces galactolipides, on trouve le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG); ce sont des lipides neutres. Ils représentent 50 à 80% des lipides rencontrés dans la membrane photosynthétique (Nishihara *et al.*, 1980; Hooper, 1984). Dans le

chloroplaste, on trouve d'autres types de lipides chargés, le phosphatidylglycérol (PG) et le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG). Ces derniers représentent 20% des lipides polaires de la membrane du thylacoïde.

Les lipides sont les principaux éléments structuraux des membranes biologiques. La structure des principaux lipides de la membrane du thylacoïde est illustrée à la figure 4. Ce sont des molécules complexes formées de deux parties: (i) une "tête" polaire soit phosphorylée soit non phosphorylée, et contenant ou ne contenant pas de charges électriques dissociées, et de ce fait fortement polaire ou hydrophile, c'est-à-dire miscible aux molécules d'eau qui se lient facilement (par des interactions électriques) avec la tête polaire, (ii) de longues chaînes d'acide gras estérifiée au glycérol, formées d'une succession de groupes carbonés $-CH_2-$ (chaque chaîne renferme 14 à 22 groupes ou plus), ne présentant aucune charge électrique dissociée, donc parfaitement apolaires ou hydrophobes.

1.3.2.2. Le rôle des principaux lipides de la membrane du thylacoïde.

Dans les chloroplastes, la quantité de MGDG est deux fois plus grande que celle du DGDG (Gounaris et Barber, 1983; Sieferman-Harms *et al.*, 1987). La portion stromatique de la membrane des thylacoïdes contient plus de DGDG, alors que les parties granaires possèdent plus de MGDG et de PG. Le tableau 1, nous donne les

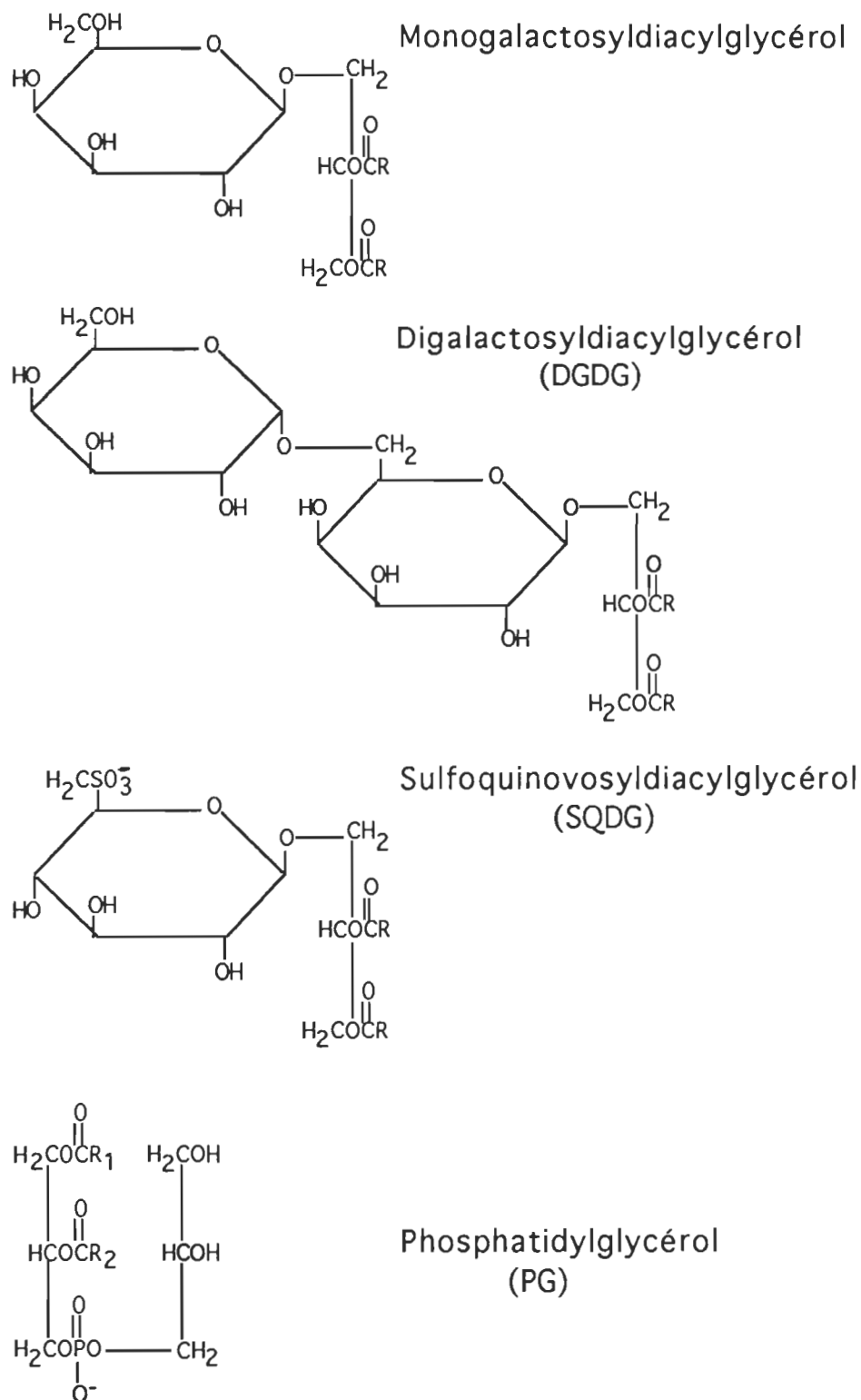


Figure 4. Structure des principaux lipides de la membrane du thylacoïde (Tiré de Hooper, 1984).

Tableau 1

Distribution en pourcentage des principaux lipides des membranes des thylacoïdes provenant de différentes espèces de plantes.

Espèces	MGDG	DGDG	PG	SQDG	Références
Épinard	38	29	14	12	Murphy et Woodrow, 1983
Tabac	52	26	2	13	Bednarz et <i>al.</i> , 1989
Pois	40	25	12	13	Li et <i>al.</i> , 1989

pourcentages relatifs de la distribution des principaux lipides des membranes des thylacoïdes provenant de différentes espèces de plantes (Murphy et Woodrow, 1983; Bednarz *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1989).

Les études rapportées par plusieurs groupes de chercheurs sur les propriétés membranaires des galactolipides, révèlent que la majorité (75%) des galactolipides (MGDG et DGDG) sont neutres (non chargés). L'empilement des thylacoïdes est probablement protégé par la présence de ces galactolipides. En solution aqueuse, le MGDG forme des structures hexagonales ou des micelles, le DGDG forme des bicouches fermées, alors que le SQDG et la PG peuvent former des bicouches et des liposomes unilamellaires (Bishop et Kenrick, 1980; Rivas et Luzzati, 1969).

Les lipides de la membrane du thylacoïde constituent la matrice dans laquelle baignent les protéines membranaires. Ce sont les principaux éléments structuraux des membranes biologiques, et ils sont impliqués dans les interactions électrostatiques au sein de la membrane. Le rôle fonctionnel de ces lipides n'est pas encore bien connu, leur distribution de part et d'autre de la membrane nous porte à croire qu'ils pourraient jouer un rôle majeur dans le maintien de la conformation, l'organisation adéquate et la stabilité des protéines intrinsèques de la membrane des thylacoïdes.

1.3.3. Les caroténoïdes

Il existe deux types de caroténoïdes dans la membrane photosynthétique: les caroténoïdes (par exemple, la β -carotène) et les xanthophylles (par exemple, la lutéine). Le rôle principal de ces molécules, notamment la β -carotène, est: (i) le transfert d'énergie d'excitation aux molécules de la chl a, (ii) la photoprotection de la chlorophylle excitée (état triplet) contre sa photooxydation par la désactivation de l'état triplet (Isler, 1971; Krinsky, 1971; Moore *et al.*, 1982).

1.3.4. Les protéines

La membrane photosynthétique est constituée de cinq complexes membranaires fixés dans la bicouche lipidique: les complexes antenne du PS II, les centres réactionnels du PS I et PS II, le complexe du cytochrome b_6/f et le facteur de couplage cF_1-cF_0 (Allred et Staehelin, 1986; Kaplan et Arntzen, 1982). Le PS I est situé au niveau des lamelles alors que le PSII est dans les grana.

1.3.4.1. Le complexe du cyt b_6/f

Le complexe protéique b_6/f (figure 5) de la membrane photosynthétique est composé de 5 polypeptides: le cytochrome f de 31.1 kDa, deux cytochromes b_6 de 23 kDa dont un de haut potentiel redox et l'autre de faible potentiel redox qui assurent le

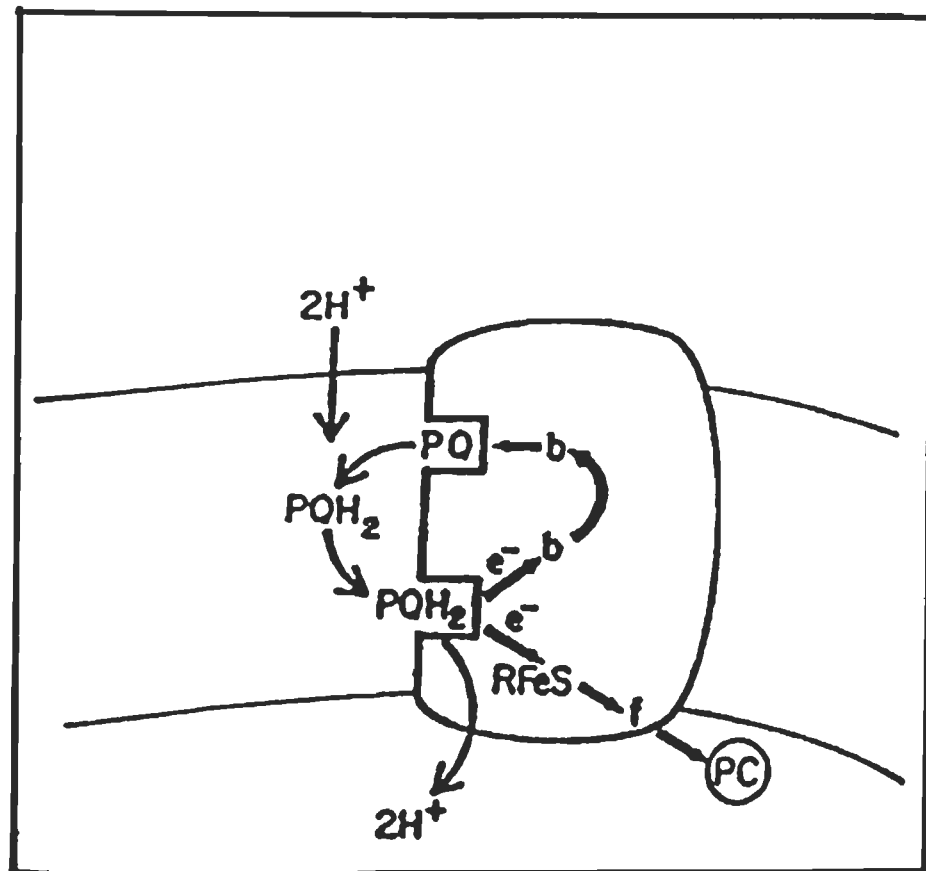


Figure 5. Le transport cyclique d'électrons dans le complexe b_6/f (Tiré de Joliot et Joliot, 1986).

transport d'électrons entre le stroma et le lumen de la membrane de thylacoïde, une protéine de Rieske 2Fe-2S (Fer-Soufre) de 20 kDa, une sous-unité IV de 18 kDa qui est liée à la protéine de Rieske et un petit polypeptide (sous-unité V) de 4 kDa découvert récemment. Le rôle de ce complexe se situe dans la région centrale de la membrane photosynthétique. C'est un transporteur d'électrons entre le PSII et le PSI (Cramer *et al.*, 1991; Adam et Malkin, 1989) par l'intermédiaire de la plastoquinone et la plastocyanine. Il est impliqué dans le transport cyclique d'électrons (Joliot et Joliot, 1986) et agit comme une pompe à protons entre le stroma et le lumen de la membrane du thylacoïde.

La figure 6 résume l'organisation topographique des quatre sous-unités individuelles de ce complexe (le cyt *f*, le cyt b_6 , la Fe-S et la sous-unité IV) et montre comment ces sous-unités pourraient être arrangées l'une par rapport à l'autre dans la membrane thylacoïdale (Cramer *et al.*, 1991; Cramer et Whitmarsh, 1977).

Les groupes hème du cyt b_6 se situent sur les côtés opposés de la membrane, à proximité de la protéine Fe-S de Rieske. L'hème du cyt *f* est aussi dans ce voisinage pour faciliter le transfert d'électrons du centre de Rieske à la plastocyanine. Ce modèle est uniquement une simplification, il montre simplement où sont localisés les groupes prosthétiques et comment ils pourraient interagir dans le complexe cyt b_6/f (figure 6).

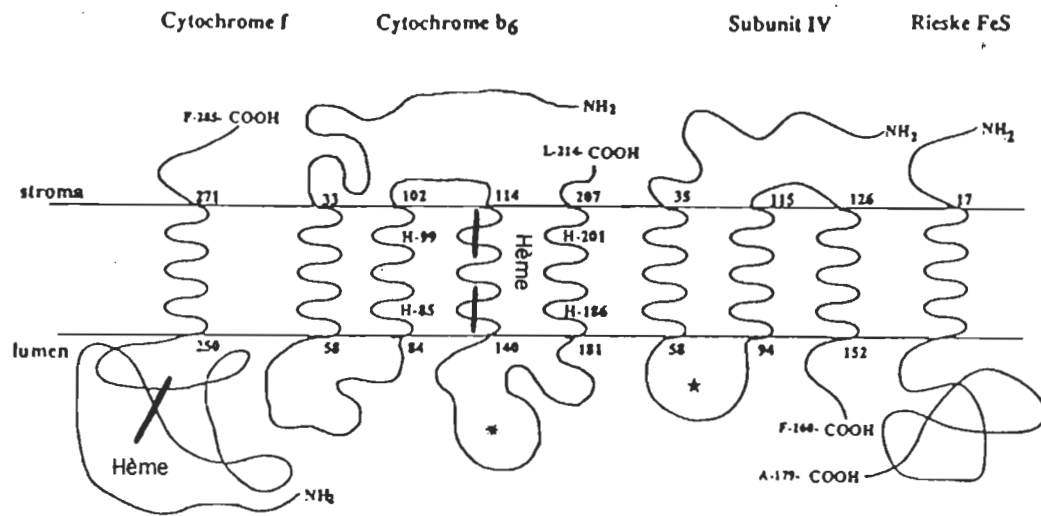


Figure 6. Modèle de l'organisation topographique des quatre sous-unités individuelles du complexes cyt b_6/f (Tiré de Cramer *et al.*, 1991).

1.3.4.2. Le cyt *f*

Le cyt *f* fait partie du complexe cyt b_6/f , il agit comme oxydo-réductase (plastoquinone-plastocyanine) au niveau de la membrane du thylacoïde (Hurt et Haska, 1981; Willms *et al.*, 1987). Le cyt *f*, étant seulement attaché à la membrane, agirait comme porte de sortie du flux d'électrons des transporteurs membranaires vers le transporteur superficiel, la plastocyanine et le PSI.

Le spectre d'absorption du cyt *f* présente trois bandes d'absorption entre 600 et 400 nm dénommées α , β et γ (figure 7). La bande γ se situe à 421 nm et correspond à la bande de SORET, la bande β à 524 nm correspond à la forme oxydée, alors que la bande α située à 554 nm correspond à la forme réduite du cyt *f* (Davenport, 1971; Gray, 1978). Jusqu'à présent, un seul modèle tridimensionnel a été proposé pour sa forme cristalline (Martinez *et al.*, 1994). Ainsi, nous ne connaissons pas l'incorporation exacte de cette protéine à l'intérieur du complexe b_6/f . En fait, le cyt *f* est un cytochrome de la catégorie C. Son potentiel standard d'oxydo-réduction est de 0.350-0.380 volt, alors que celui du cyt c mitochondrial est de + 0.265 volt. La bande α de sa forme réduite située à 554 nm est très proche de celle du cyt c. Il est beaucoup plus difficilement soluble que le cytochrome c et se dénature à température élevée. Il a un poids moléculaire d'environ 31 kDa correspondant à 285 résidus d'acides-aminés (Willey *et al.*, 1984; Horton et Cramer, 1974; Gray, 1992) et contient un hème par cytochrome.

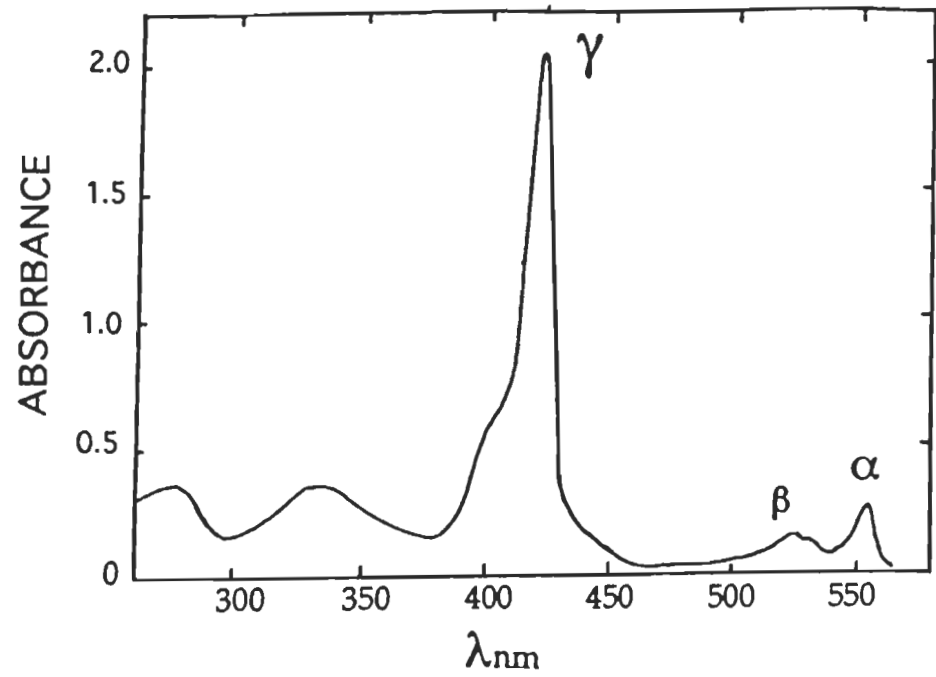


Figure 7. Spectre d'absorption du cyt *f* pris dans une solution de tampon phosphate à 50 mM, pH: 7.5 (Tiré de Gray, 1978).

1.3.4.3. La composition en acides aminés du cyt *f*

Le cyt *f* a fait l'objet de plusieurs études sur son extraction (Gray, 1978; Gray, 1992), sa purification (Ho et Krogmann, 1980) et sa séquence d'acides aminés (Willey *et al.*, 1984). Le point de départ de l'analyse de cette protéine se situe dans une bonne compréhension de la succession linéaire des acides aminés à l'intérieur du squelette polypeptidique. Sa séquence d'acides aminés suggère que le cyt *f* est formé de trois portions (figure 8):

- 1) Une portion globulaire incluant le N-terminal et le groupement hème, situé du côté intra-thylacoïdal (1-250);
- 2) Une portion transmembranaire très hydrophobe (251-270);
- 3) Une portion portant le C-terminal, situé du côté du stroma (270-285);

Certains auteurs (Willey *et al.*, 1984) ont rapporté que le cyt *f*, extrait selon la méthode de Gray (Gray, 1978), pourrait être dépourvu de son domaine transmembranaire et du C-terminal. Ces auteurs ont aussi démontré que la portion servant à ancrer le cyt *f* à la membrane serait la section transmembranaire comprenant les acides aminés situés entre la valine 251 et la leucine 270 (figure 8). Ils ont mentionné que cette section est constituée de 21 acides aminés et qu'elle est probablement clivée de la membrane lors de l'extraction de la protéine. Le clivage de cette section rend le cytochrome *f* soluble. Ils ont conclu que la partie transmembranaire du cyt *f* peut former des agrégats, des octamères

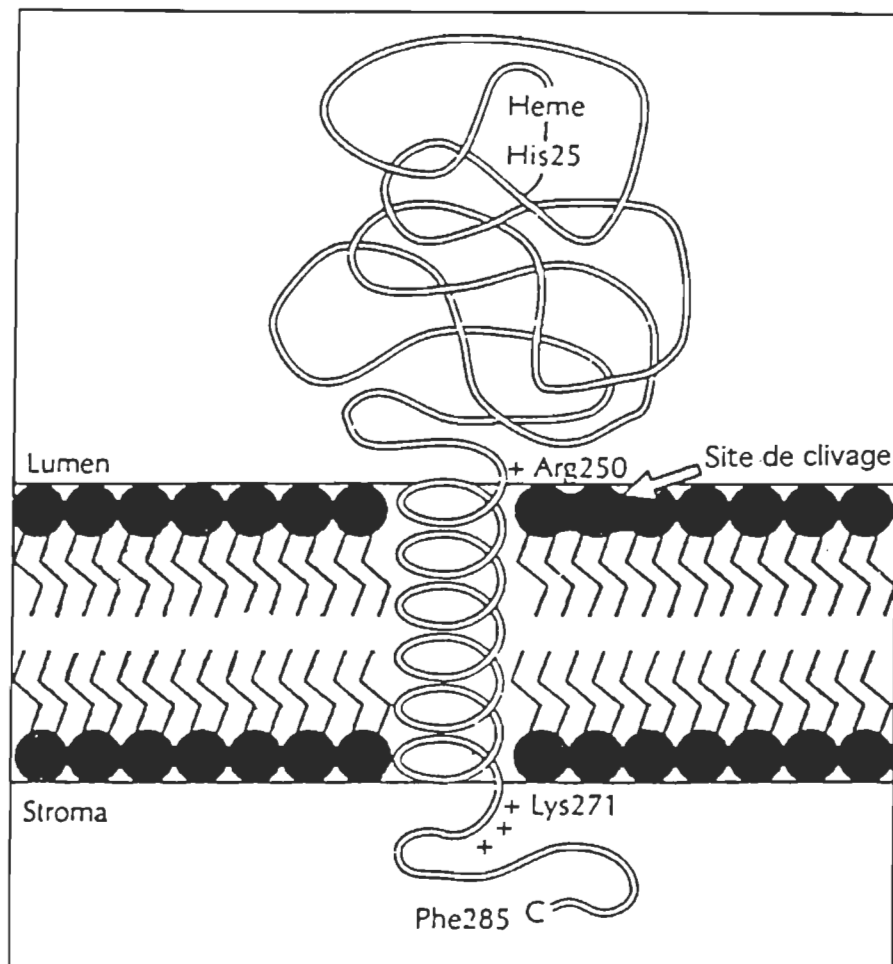


Figure 8. Modèle de la topographie du cyt *f* dans la bicouche lipidique membranaire (Tiré de Martinez et *al.*, 1994).

en solution aqueuse. Le cyt *f*, comprenant seulement la partie globulaire et le N-terminal, existe sous la forme de monomère en solution.

Les données des séquences nucléotidiques et de la protéine (Alt et Herrmann, 1984; Willey *et al.*, 1984) montrent que l'His 25 est un ligand de l'hème dans la région N-terminal du cyt *f*. Les autres résidus liant l'hème pourraient être la Lys 145 ou Lys 222. La distribution des résidus hydrophobes indique que l'hème se trouve vers le lumen du côté de la membrane, dans le long segment N-terminal relativement polaire: résidus (1-250), et que la protéine est ancrée à la membrane par un long segment hydrophobe proche du C-terminal. La localisation de l'hème et de la plupart des acides-aminés polaires du cyt *f* sur le côté lumen de la membrane, lui permet d'interagir avec son accepteur d'électrons qui est la plastocyanine (Hurt et Hauska, 1981; Willms *et al.*, 1987).

Le point essentiel pour la compréhension du processus de transfert d'électrons entre le PSII et le PSI, via le complexe cyt *b₆/f*, est basé sur la connaissance de la structure de la plastocyanine et du cyt *f*. Actuellement, la structure cristalline de la plastocyanine est largement étudiée (Guss et Freeman, 1983). Cependant, l'avancement des études sur le processus de transfert d'électrons, particulièrement entre le "pool" de la plastoquinone et la plastocyanine, est retardé par le manque d'informations concernant la configuration spatiale du cyt *f* dans la membrane du thylacoïde.

Compte tenu de l'importance du cyt f dans la composition et les fonctions qu'il possède au sein de la membrane, il s'est avéré nécessaire d'étudier la structure de cette protéine dans un système modèle comme celui de la monocouche à l'interface air-eau et du film Langmuir-Blodgett.

1.4. Les modèles membranaires

L'étude des systèmes biologiques est souvent limitée par la complexité structurelle que présentent les membranes biologiques. L'utilisation des modèles membranaires contribue largement à la compréhension de la structure et des fonctions attribuées aux membranes biologiques. Afin d'aboutir à la création d'un élément de structure capable de mimer à l'échelle moléculaire les caractéristiques de l'organisation structurelle et fonctionnelle de la membrane biologique naturelle, une variété d'approches basées sur des systèmes modèles sont développées et utilisées.

Les modèles généralement utilisés dans le domaine de la biologie et de la biophysique moléculaire sont les vésicules (ou liposomes), les bicouches lipidiques (Monnier et Monnier, 1964; Ringsdorf *et al.*, 1988; Hoshina et Ithoh, 1987; Kédzy, 1972) et les films monomoléculaires à l'interface air-eau (Gaines, 1966). Ce sont des modèles simples dont les structures impliquent des lipides et des protéines. Ainsi, nous pouvons étudier les propriétés physico-chimiques des membranes reconstituées à partir des composantes moléculaires pures ou en mélanges.

1.4.1. Les bicouches

L'étude de l'organisation des principaux constituants membranaires est relativement récente. En 1925, Gorter et Grendel proposent le premier modèle de la structure de la membrane biologique. Ces auteurs ont montré que l'aire de la couche lipidique extraite de globules rouges occupe à l'interface air-eau le double de la surface dont elles proviennent. Dans ce modèle les auteurs n'ont pas tenu compte de la présence des protéines, éléments essentiels dans la structure fonctionnelle de la membrane naturelle. Ces derniers prévoient que la membrane biologique est simplement constituée d'une bicouche lipidique.

Un peu plus tard, Danielli et Davson (1935) proposent qu'une couche de protéines globulaires est adsorbée de part et d'autre à la surface de la bicouche lipidique. De plus, ces auteurs prévoient que la conformation de la protéine est grandement modifiée suite à son adsorption. Il faut attendre Singer et Nicholson (1972) pour qu'on réalise que certaines protéines sont incorporées à la surface chargée de la bicouche lipidique, alors que d'autres sont liées intégralement à la membrane.

Bien que ce modèle soit le plus couramment utilisé afin d'expliquer les fonctions membranaires attribuées aux protéines et de comprendre la réalité de la membrane biologique, il présente certaines faiblesses en ce qui concerne l'activité de surface et la structure des protéines membranaires.

En général, les membranes cellulaires sont constituées de lipides et de protéines qui diffèrent qualitativement et quantitativement. La composition en poids de protéines et de lipides de diverses membranes cellulaires est illustrée dans le tableau 2. La membrane photosynthétique est constituée de lipides et de protéines en des proportions (p/p) équivalentes.

Dans la bicouche lipidique, les protéines interagissent avec les lipides en très faible fraction molaire, le rapport molaire protéine/lipide pour diverses membranes cellulaires varie entre 1/60 et 1/100 (Gennis, 1989). La plupart des membranes possèdent une double couche parallèle de lipide, orientée avec une région non polaire vers le milieu interne (chaînes d'acides gras) et une région polaire faisant face au milieu aqueux environnant. Cependant, elles diffèrent les unes des autres, par leur épaisseur suivant l'arrangement des molécules et le degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées. Les interactions hydrophobes entre les chaînes d'acides gras des molécules lipidiques permettent une organisation des membranes biologiques. Les chaînes latérales d'acides aminés permettent aux protéines de s'associer avec les extrémités non polaires des lipides et les molécules d'eau. Les couches de lipides et de protéines sont retenues ensemble par les forces électrostatiques et de van der Waals.

Tableau 2

Pourcentage en poids de protéines et de lipides
de diverses membranes cellulaires.

Membranes	Lipides	Protéines
Chloroplaste	50	50
Myéline	80	20
Microsome	32	68
Mitochondrie	26	74

(Tiré de Robertson, 1983).

1.4.2. Les films monomoléculaires

La technique des films monomoléculaires la plus courante est celle qui consiste à organiser à une interface un lipide, une protéine amphiphile ou un mélange d'amphiphiles (lipides-protéines) préalablement dissous dans un solvant volatil non miscible à l'eau. L'étalement des molécules amphiphiles à l'interface air-eau conduit à la formation d'une monocouche (Gaines, 1966), les molécules seront orientées, les têtes polaires hydrophiles dans l'eau, tandis que les chaînes d'acides gras hydrophobes seront dans l'air. Une fois ces molécules étalées à l'interface air-eau, il est possible de les caractériser en mesurant les propriétés mécaniques (pression de surface: Π) et électriques (potentiel de surface: ΔV) en fonction de l'aire moléculaire (A). Ces mesures nous permettent d'obtenir des informations sur l'orientation du moment dipolaire, la structure géométrique des molécules amphiphiles et les transitions de phase (Ringsdorf *et al.*, 1988). Ces études permettent aussi d'identifier les interactions inter-moléculaires (lipide-lipide, protéine-protéine ou lipide-protéine) ainsi que les interactions entre les molécules de la monocouche et les substances dissoutes dans la sous-phase.

Un des avantages distinctifs et exclusifs de l'utilisation de cette technique est notamment, la possibilité de varier la pression exercée sur les molécules et d'examiner leurs comportements interfaciaux.

Le film monomoléculaire étalé à la surface de la sous-phase peut être transféré sur un substrat solide comme le verre, le quartz, le mica, le graphite ou l'or, en vue d'études spectroscopiques, électroniques, microscopiques ou d'applications techniques. Les principaux auteurs de cette technique de déposition sont "Langmuir et Blodgett"; ce sont les premiers qui ont réussi à transférer une monocouche sur substrat afin de la caractériser.

Le choix de ce modèle est dû, en partie, à la facilité technique de la préparation du film monomoléculaire à l'interface air-eau et en film de Langmuir- Blodgett (L-B). Jusqu'à présent, ce modèle est le plus fréquemment utilisé comme modèle membranaire capable de simuler la moitié de la membrane bimoléculaire.

1.5. Étude des protéines à l'interface air-eau

1.5.1. Épandage d'une protéine à l'interface air-eau

Les travaux antérieurs, réalisés sur l'épandage des protéines à l'interface air-eau, ont montré qu'une protéine totalement étalée à l'interface air/eau occupe souvent une aire moléculaire de $1 \text{ m}^2/\text{mg}$ (Kashiwagi, 1958; MacRitchie, 1986; Krebs *et al.*, 1988). Dans ces conditions, ses structures secondaire et tertiaire sont affectées, provoquant ainsi sa dénaturation. Ceci est souvent le cas pour les molécules flexibles, telles que la β -caséine dont les pourcentages en hélices- α et les liens disulfures sont faibles. Comme les portions hydrophobes (hélices- α ou feuillets- β) sont enfouies dans

le coeur de la protéine en solution, une fois à l'interface air/eau, et sous l'effet de la dénaturation causée par la surface, elles peuvent être partiellement éjectées dans la phase aérienne sous forme de segments et de queues. Il en résulte une augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse, causée par le dépliement de la monocouche.

La plupart des protéines ne peuvent être répandues à la surface de l'eau pure ou de solutions aqueuses sans perte d'une certaine quantité dans la sous-phase. Plusieurs travaux réalisés sur l'épandage des protéines ont montré qu'une protéine bien étalée correspond à une concentration interfaciale de 1 mg/m^2 . Cependant, il est conseillé de déposer la moitié de cette quantité soit 0.5 mg/m^2 afin d'éviter toute perte des molécules dans la sous-phase (Kézdy, 1972; Taneva *et al.*, 1984; MacRitchie, 1986).

Les détails sur la technique de préparation des films monomoléculaires protéiques et les mesures des isothermes Π -A: pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (A), seront présentés dans le chapitre 3.

1.5.2. Influence de certains paramètres sur la stabilité de la monocouche

La stabilité des couches protéiques monomoléculaires est liée à un ensemble de contraintes expérimentales:

- La cuve utilisée
- La nature du solvant d'étalement et le temps laissé pour son évaporation
- La concentration, C , de la solution d'épandage
- Le volume, V , épandu
- La température, T
- La nature de la sous-phase aqueuse
- La vitesse, V , de compression

Lorsque ces paramètres sont déterminés, il est possible de caractériser les propriétés mécaniques (Π) et électriques (ΔV) relatives aux interactions entre les molécules protéiques de la monocouche et les substances dissoutes dans la sous-phase.

1.6. Études des films mixtes à l'interface air-eau

La formation des couches monomoléculaires à l'interface air-eau est une opération délicate. La réalisation des films mixtes peut se faire, soit en les étalant à la surface de la sous-phase l'un après l'autre (Davies *et al.*, 1984; Heckl *et al.*, 1987; Taneva *et al.*, 1984), soit en mélangeant les deux constituants purs en solution (Maget-Dana *et al.*, 1989; MacRitchie, 1986). La miscibilité et les interactions intermoléculaires peuvent être évaluées par la règle d'additivité et par l'énergie libre en excès du mélange formant le film monomoléculaire (Gaines, 1966).

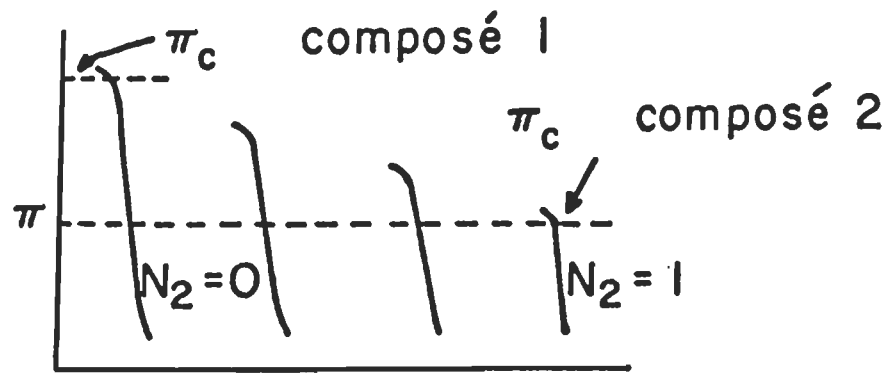
On peut distinguer un film homogène d'un film hétérogène en examinant la pression de collapse, Π_c , du film mixte en fonction des fractions molaires, N . Dans le cas de composés miscibles, Π_c varie régulièrement avec les fractions molaires respectives des deux composés 1 et 2. S'il y a séparation de phase, c'est la pression de collapse la plus basse des deux films formés à partir de chaque molécule seule qui va conditionner la stabilité de la monocouche. L'évolution de la pression de surface au collapse selon la miscibilité des composés est représentée dans la figure 9.

La monocouche dans laquelle les composants sont immiscibles doit obéir à la loi d'additivité exprimée par l'équation suivante (Gaines, 1966):

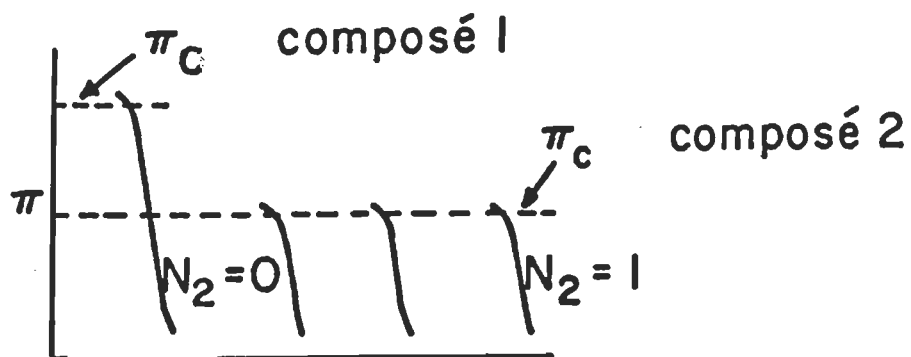
$$A_{1,2}^{\Pi} = N_1 A_1^{\Pi} + N_2 A_2^{\Pi}$$

où, $A_{1,2}^{\Pi}$ est l'aire moléculaire du mélange 1-2 à une pression donnée, A_1^{Π} et A_2^{Π} sont les aires moléculaires des constituants purs 1 et 2 à la même pression, et N_1 et N_2 sont les fractions molaires de ces constituants. Toute déviation du comportement de la monocouche par rapport à cette loi démontre qu'il y a miscibilité dans le film et qu'il existe une interaction entre les deux composés (Gaines, 1966, Kézdy, 1972).

Il est possible pour des monocouches mixtes de mesurer l'énergie libre en excès, résultant de l'interaction entre les deux composés à l'interface air/eau, à partir de l'équation suivante:



A
Composés miscibles



A
Composés non miscibles

Figure 9. Évolution de la pression de surface au collapse selon la miscibilité des composés 1 et 2 (Tiré de Gaines, 1966).

$$\Delta G_{1,2}^{\Pi} = N_0 \int_0^{\Pi} (A_{1,2}^{\Pi} - N_1 A_1^{\Pi} - N_2 A_2^{\Pi}) d\Pi$$

où $\Delta G_{1,2}^{\Pi}$ représente l'énergie libre en excès du mélange lorsque le film monomoléculaire est comprimé jusqu'à une pression de surface (Π), N_0 est le nombre d'Avogadro. Les valeurs de A et ΔG sont évaluées graphiquement à partir des isothermes Π - A des composés purs et des mélanges.

Les détails sur la technique de préparation des films mixtes monomoléculaires (lipide-protéine) et les mesures des isothermes Π - A : pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (A), seront donnés dans le chapitre 3.

1.7. Étude des interactions lipide-protéine par la technique des monocouches

Les études réalisées principalement sur les lipides, les protéines et les mélanges lipides-protéines par la technique des monocouches sont souvent utilisées afin de mimer l'organisation qu'adoptent les lipides, les protéines et les mélanges lipide/protéine au sein des membranes biologiques. Ces études ont apporté une grande quantité de données additionnelles concernant les propriétés physiques de la structure bilipidique des membranes biologiques (Es-Sounni, 1993; Lamarche, 1988).

Plusieurs travaux concernant les lipides, les protéines, les chlorophylles ainsi que leurs mélanges ont été effectués en utilisant la technique des monocouches (Gaines, 1966; Birdi, 1989; Tancredi *et al.*, 1982; Guay et Leblanc, 1987; Graham et Phillips, 1977; Davies *et al.*, 1983; MacRitchie, 1986). Le but de ces études est de saisir le fonctionnement organisationnel de ces systèmes. Elles visent principalement à caractériser les effets essentiels de certains paramètres énergétiques (la pression de surface et le potentiel de surface) ainsi que leur influence sur l'incorporation de la protéine dans une monocouche lipidique. Jusqu'à présent, en ce qui concerne le cyt *f* et le mélange lipide/cyt *f*, peu d'études ont été réalisées sur la structure et l'organisation de cette protéine à l'interface air/eau et en film L-B.

Chin et Brody (1975,1976) ont été les premiers à étudier les monocouches de cyt *f* et de mélange chlorophylle a/cyt *f* à l'interface air/eau. L'isotherme (Π -A) du cyt *f* oxydé (ferricyanure de potassium) et réduit (ascorbate de sodium) rapporté par ces auteurs présente une pression de surface non nulle aux grandes aires moléculaires. L'arrêt de la compression à 10 mN/m ne présente pas de collapse bien défini. Dans le cas du mélange chl a/cyt *f* à différentes fractions molaires de cyt *f*, l'étude rapportée par ces auteurs, révèle l'existence d'une large interaction entre le cyt *f* réduit et la chl a. Le maximum d'interaction est observé pour un rapport cyt *f*:chl a de 1:2 dans le cas du cyt *f* réduit, alors qu'elle diminue pour un rapport de 1:3 dans le cas du cyt *f* oxydé.

Nous pouvons soulever certaines limites vis-à-vis de la véracité et de l'exactitude des résultats présentés par ces auteurs. Dans un premier temps l'isotherme Π -A du cyt *f* oxydé et réduit rapporté par ces auteurs, présente une pression de surface non nulle aux grandes aires moléculaires. Cette constatation nous laisse croire qu'il y a probablement certaines impuretés qui peuvent dénaturer la protéine et fausser l'aire moléculaire déterminée.

La deuxième remarque que nous soulevons concerne l'arrêt de la pression de surface à 10 mN/m, impliquant ainsi l'absence du collapse. Ceci nous amène à douter de l'homogénéité du film et de son organisation à la surface de l'eau.

Finalement, ces auteurs n'ont pas mentionné ni la concentration du cyt *f* ni le solvant utilisé pour l'étalement du film monomoléculaire, ce qui nous amène à conclure qu'il y a probablement une solubilisation de certaines particules dans la sous-phase et une instabilité du film à l'interface air/eau.

Suite aux travaux de Chin et Brody (1975,1976), d'autres études ont été réalisées sur le cyt *f*, le mélange chl a/cyt c et chl a/cyt*f* à l'interface air/eau. Parmi ces travaux, on trouve notamment ceux de Lamarche (1988a et 1988b). Dans le cas du système mixte chl a/cyt c, l'auteur a étudié les propriétés interfaciales de ce mélange à des proportions de 18:1. Il a constaté que, suite à l'injection du cyt c dans la sous-phase, la pression et le potentiel de surface augmentent de 2 mN/m pour Π et de +75 mV

pour ΔV . Lorsque le film mixte est soumis à une première décompression, un décalage progressif des isothermes Π -A et ΔV -A vers les plus grandes aires moléculaires est observé. Ce décalage indique que la quantité de protéines incorporées augmente graduellement. Lorsque le film mixte est recomprimé, les isothermes de pression et de potentiel de surface continuent d'augmenter vers les plus grandes aires moléculaires. Les différences observées, au niveau des propriétés mécaniques et électriques entre le film mixte et le film de chl a, nous indiquent que l'incorporation du cyt c dans la monocouche de chl a est irréversible. Cette irréversibilité est une indication directe de l'existence d'une forte interaction entre les deux composés (Lamarche *et al.*, 1988).

L'étude concernant le mélange chl a/cyt *f*, rapportée par Lamarche (1990), montre qu'après l'incorporation du cyt *f* au film de chl a il y a un accroissement immédiat de la pression de surface. Ces accroissements indiquent que l'incorporation de la protéine dans le film de chl a se produit instantanément après son addition. Il est à noter que cette augmentation a déjà été observée dans le cas du mélange chl a/cyt c. L'auteur a conclu que le cyt *f* interagit fortement avec la chl a.

Il s'avère que "*in vivo*", la chlorophylle a ne se fixe pas au cyt *f* mais se retrouve plutôt accrochée à des polypeptides transmembranaires. Puisque le cyt *f* est une protéine polaire ancrée

à la surface de la membrane des thylacoïdes, il semble donc que la partie hydrosoluble du cyt *f* et la chl *a* ne sont jamais en contact.

Dans une autre étude, l'auteur (Lamarche *et al.*, 1988b; Lamarche *et al.*, 1990) a démontré par les mesures de radioactivité de surface du cyt *c* marqué qu'il y a une solubilisation de certaines particules de cyt *c* dans la sous-phase. Il a estimé qu'environ 25% des molécules initialement déposées se sont pas solubilisées dans la sous-phase. Dans cette étude, l'auteur a négligé l'effet de la concentration interfaciale sur la solubilisation des particules. Il a été démontré par MacRitchie (1986), qu'à grande concentration initiale, les molécules de protéines peuvent exercer les unes sur les autres une pression qui peut affecter l'efficacité de leur épandage et causer en partie leur désorption de la monocouche.

L'étude la plus récente effectuée dans ce domaine fut réalisée par Es-Sounni (1993). Dans cette étude, l'auteur a examiné l'effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. La protéine est déposée directement sur la surface de la sous-phase par la méthode de Trurnit (Trurnit, 1960) et par la méthode classique à partir d'une solution aqueuse contenant 50% d'éthanol. Il a mentionné que l'épandage de la protéine à l'interface air/eau dépend principalement du paramètre critique qui est la concentration interfaciale initiale. Il a conclu que l'accroissement de l'aire moléculaire en fonction de la concentration du cyt *f* est la preuve d'une plus grande rétention des molécules protéiques à la surface de la cuve. Il a aussi ajouté que l'invariabilité du potentiel

de surface en fonction de la concentration interfaciale suggère que la structure moléculaire demeure inchangée à l'interface. Les changements observés dans les isothermes Π -A et ΔV -A par rapport à l'aire moléculaire sont simplement dus à la désorption des molécules dans la sous-phase, provoquée par l'effet de la concentration interfaciale initiale. *In vivo*, ces changements peuvent être attribués à l'orientation organisationnelle du cyt *f*, à son pouvoir redox et à son incorporation dans la membrane du thylacoïde.

Les expériences réalisées par la méthode de Trurnit sur le cyt *f* (Es-Sounni, 1993) ne donnent pas de résultat satisfaisant; les isothermes Π -A ne sont pas reproductibles et l'aire moléculaire obtenue pour chaque isotherme apparaît beaucoup plus faible que celle attendue. L'auteur a expliqué ce phénomène par la solubilisation d'une partie importante des particules de cyt *f* dans la sous-phase.

Afin de déterminer les facteurs qui gouvernent les changements structuraux du cyt *f* et la nature des interactions lipide/cyt *f*, il apparaît nécessaire d'étudier l'effet de la concentration interfaciale, du solvant d'étalement, du pH de la sous-phase et de la pression sur la stabilité de la monocouche. L'ajustement de ces paramètres est nécessaire afin de minimiser la solubilité de la protéine dans la sous-phase. Ainsi, il est possible de caractériser plus précisément la monocouche de cyt *f* et du mélange lipide-cyt *f* en mesurant les propriétés de la pression de

surface (Π) et du potentiel de surface (ΔV) en fonction de l'aire moléculaire (A). Ces mesures permettent d'obtenir des informations sur l'organisation et la stabilité de la monocouche à l'interface air/eau, information qu'on ne peut acquérir à l'aide des autres modèles (Ringsdorf *et al.*, 1988).

1.8. Étude de la structure des films L-B par la microscopie à champ proche (SPM: Scanning Probe Microscopy)

La microscopie à champ proche (la microscopie à effet tunnel (STM) et la microscopie à force atomique (AFM)) est une nouvelle technique d'investigation des surfaces. Elle a été mise au point par Binnig et Rohrer en 1982 (Binnig *et al.*, 1986). Son champ d'analyse s'étend à des domaines divers de la physique des surfaces (Hamers *et al.*, 1987; Boland, 1990; Feenstra, 1991; Barth *et al.*, 1990), de la chimie des interfaces (Fuchs *et al.*, 1992; Zasadzinski *et al.*, 1994) ainsi qu'à l'étude des matériaux biologiques (Brown et You, 1991; Heckl *et al.*, 1991; Driscoll *et al.*, 1990; Fisher *et al.*, 1990, Edstrom *et al.*, 1989).

Durant les dix dernières années, la SPM s'est largement développée. Actuellement, il est devenu possible avec cette technique d'élargir la connaissance de l'architecture moléculaire et son influence sur la relation entre les phases bidimensionnelles des films monomoléculaires.

L'étude de la topographie des films L-B de la bactériorhodopsine (bR) de la membrane pourpre incorporée dans des films de phosphatidylcholine (PC), déposée sur le graphite (HOPG), montre une bonne organisation de la protéine dans la matrice lipidique de PC (Niemi *et al.*, 1993). La distance intermoléculaire des groupes méthyle de la PC mesurée à partir des images STM est de 0.41-0.50 nm. Tandis que celle des extrémités polaires est de 0.65-0.70 nm.

Dans une autre étude, Butt *et al.* (1991) ont aussi visualisé la structure des films L-B de la bactériorhodopsine déposée sur le verre et le mica. Ces auteurs ont rapporté que la résolution des images AFM de la protéine déposée sur le mica est meilleure que celle de la protéine adsorbée sur une bicouche d'acide arachidique. Les images AFM rapportées par ces auteurs montrent que les molécules de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre possèdent un arrangement hexagonal. La résolution atteinte par l'AFM dans cette étude est de 1.1 nm.

Fujiwara *et al.* (1992) ont visualisé par l'AFM la structure des films L-B de la glucose oxydase mélangée avec l'acide arachidique. Le substrat utilisé pour la déposition des films est le mica. Les images AFM montrent clairement des agrégats de protéines ayant 20 à 50 nm de diamètre. L'aire moléculaire de l'acide arachidique déterminée à partir des images AFM est de 0.26 nm². Cette valeur est en accord avec celle mesurée à l'interface air/eau.

Fare *et al.* (1992) ont étudié par l'AFM le mélange lipide-protéine en films L-B. Les images rapportées par ces auteurs ont révélé que le mélange acétylcholine/di-palmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (DPPE), déposé sur un substrat de silicium, forme des domaines et des agrégats de protéines et de lipides.

La tendance des protéines à former entre elles des domaines et des agrégats a aussi été confirmée dans le cas de l'actine F (Braunstein, 1995; Henderson *et al.*, 1992), de l'immunoglobuline (Lin *et al.*, 1990) et de la fibrine (Drake *et al.*, 1989). Les travaux réalisés par STM et AFM sur les lipides, les protéines et les mélanges lipides-protéines en films L-B sont nombreux. Nous référons le lecteur intéressé aux aspects structuraux des films L-B à consulter l'étude de DeRose et Leblanc (1995) sur l'ensemble des travaux publiés récemment.

D'autres techniques, comme la microscopie optique (OM), les rayons-X et la diffraction d'électrons peuvent être utilisées pour obtenir des informations structurales. Cependant, ces techniques possèdent une résolution limitée. Contrairement au microscope électronique à balayage (SEM: Scanning Electron Microscope) et à transmission (TEM: Transmission Electron Microscope), l'STM et l'AFM ne nécessitent pas la présence du vide (UHV: Ultra-High Vacuum), ils peuvent fonctionner dans l'air et à température ambiante.

En effet, l'utilisation de la SPM (STM et AFM) permet d'obtenir des informations précieuses sur la structure topographique réelle avec un haut degré de résolution pouvant atteindre l'échelle moléculaire. Cette nouvelle technique est très performante pour caractériser les transitions de phase et visualiser les domaines et les agrégats dans la monocouche. La structure réelle des films L-B est aujourd'hui à notre portée et constitue une nouvelle approche des systèmes physiques bidimensionnels. Les détails sur les principes de base et le fonctionnement de l'STM et de l'AFM sont donnés dans le chapitre 2.

1.9. But de notre travail

Compte tenu de l'importance du cyt *f* dans la composition et les fonctions qu'il possède au sein de la membrane photosynthétique, le présent projet vise à étudier les propriétés interfaciales et structurales du cyt *f* et du mélange MGDG/Cyt *f* et DGDG/Cyt *f*. Le choix de ces deux galactolipides est justifié puisque l'analyse des lipides des membranes des thylacoïdes révèle que la majorité (75%) sont neutres, soit le MGDG et le DGDG. Ces derniers constituent la matrice dans laquelle baignent les protéines membranaires.

Notre travail est basé sur l'utilisation d'un système biomimétique, soit celui des monocouches à l'interface air/eau et des films Langmuir-Blodgett (L-B). Notre approche consiste à soumettre le film à des cycles d'expansion originant de fortes et faibles pressions de surface. Dans un premier temps, on se propose d'étudier les propriétés mécaniques (pression de surface: Π) et électrique (potentiel de surface: ΔV) en fonction de l'aire moléculaire (*A*) du cyt *f*.

Le but de notre étude vise principalement à caractériser la stabilité conformationnelle du cyt *f* à l'interface air-eau. Cette étape est très importante puisque la stabilité de la monocouche dépend beaucoup de l'état de la sous-phase: force ionique, pH. La plupart des protéines ne peuvent être répandues sur l'eau pure sans perte d'une certaine quantité dans la sous-phase. Afin de minimiser

ces pertes, il est essentiel de contrôler certains paramètres comme la méthode d'épandage de la protéine, le solvant d'épandage et la quantité optimale à déposer. Le contrôle de ces paramètres est nécessaire afin de minimiser la solubilité de la protéine dans la sous-phase. Il permet de vérifier quantitativement si la protéine est affectée ou non par la dénaturation de surface.

L'étape suivante concerne l'étude de la structure des films L-B du cyt *f* et du mélange MGDG/Cyt *f* et DGDG/Cyt *f* par la microscopie à effet tunnel (STM) et à force atomique (AFM). Cette technique nous permet de visualiser directement des petites aires avec une définition remarquable et un haut degré de précision, pouvant atteindre la résolution à l'échelle moléculaire. L'utilisation de ces deux récentes techniques d'investigation des surfaces pour la visualisation des films L-B de cyt *f* et de mélange MGDG/Cyt *f* et DGDG/Cyt *f* devrait aider à déterminer l'état physique de la monocouche, l'homogénéité, la structure des différentes phases rencontrées au cours de la compression, ainsi que la présence éventuelle de domaines, d'agrégats et de défauts.

Afin de mieux cerner qualitativement les indices qui peuvent nous informer sur les changements conformationnels du Cyt *f* à l'interface air-eau et l'influence de la pression de surface sur l'incorporation de la protéine à la monocouche lipidique, nous désirons produire des films minces comportant une architecture moléculaire bien contrôlée. De plus, nous proposons d'étudier l'effet du solvant d'étalement (éthanol), de la pression et du

substrat sur la structure des films L-B du Cyt *f* et du mélange MGDG/Cyt *f* et DGDG/Cyt *f*.

L'analyse et l'interprétation de la structure des films visualisés par STM et AFM nous permettrons d'obtenir des informations précieuses sur la topographie des films, d'identifier plus précisément les facteurs qui gouvernent les changements structuraux du cyt *f* et de vérifier si la protéine incorporée dans le système mixte qu'on se propose d'étudier est affectée ou non par la dénaturation de surface. Une comparaison directe des structures obtenues, à l'aide de ces deux techniques, permettrait de justifier la topographie réelle des films visualisés.

CHAPITRE 2

DESCRIPTION DE LA MICROSCOPIE À CHAMP PROCHE: LA MICROSCOPIE À EFFET TUNNEL ET À FORCE ATOMIQUE

2.1. Microscopie à effet tunnel

La microscopie à effet tunnel (STM: Scanning Tunneling Microscopy) est une technique qui nous permet de visualiser directement les petites aires avec une définition remarquable et un haut degré de précision, pouvant atteindre la résolution à l'échelle moléculaire.

2.1.1. Principe de base de la microscopie à effet tunnel

Le principe de mesure de la STM consiste à approcher une pointe métallique extrêmement fine constituant l'une des électrodes (fil de tungstène) à la surface d'un échantillon conducteur constituant la deuxième électrode. La pointe et l'échantillon sont séparés par une zone d'air isolante de faible épaisseur, de l'ordre de 1nm (Binnig et Rohrer, 1982; O gletree et

Salmeron 1990; Zasadzinski, 1989). La faible différence de tension (± 0.1 à 0.2 V) appliquée entre la pointe et la surface de l'échantillon crée un courant tunnel de l'ordre du nanoampère (0.1 à 50 nA). Cette situation rend possible le passage des électrons par effet tunnel à travers la pointe/air/échantillon. La densité de ce courant par unité de surface s'exprime selon l'expression suivante:

$$J = \frac{e^2}{h} \frac{k_o}{4\pi^2 S} V A_{\text{eff}} \exp(-2k_o S) \quad (\text{nA/nm}^2)$$

avec,

$$k_o = \sqrt{(2m_e/h^2)\phi}$$

et

$$\phi = \frac{\phi_p + \phi_s}{2}$$

où,

A_{eff} : Section efficace traversée par le courant tunnel (nm^2)

S : Distance entre la pointe et l'échantillon (nm)

V : Tension appliquée entre la pointe et l'échantillon (V)

h : Constante de Planck (6.626×10^{-34} J.S)

e : Charge de l'électron (1.602×10^{-19} C)

m_e : Masse de l'électron (9.1094×10^{-31} kg)

ϕ : Fonction de travail moyenne des deux métaux (eV)

ϕ_p : Fonction de travail de la pointe (eV)

ϕ_s : Fonction de travail de la surface de l'échantillon (eV)

La sensibilité du courant tunnel dépend en partie de la structure électronique de la surface de l'échantillon, mais surtout, de la qualité de la pointe utilisée. La dépendance du courant en fonction de la distance inter-électrode est un point clé du fonctionnement du microscope. Le schéma de base de fonctionnement du microscope à effet tunnel est représenté dans la figure 10.

2.1.2. Mode d'opération du microscope à effet tunnel

Le microscope à effet tunnel (STM) fonctionne généralement en mode courant constant. Dans ce mode, le courant tunnel est maintenu constant durant le balayage de la surface (0.5 à 1 seconde par ligne). La surface de l'échantillon peut être aussi balayée en mode hauteur constante. Dans ce cas, la pointe est balayée sans déviation selon l'élément Z du piézo-électrique.

Les paramètres expérimentaux les plus importants à contrôler lors du balayage, et qui sont nécessaires au bon fonctionnement du microscope sont : la distance de séparation (Z) entre la pointe et la surface de l'échantillon, le courant tunnel (I_t), la tension électrique (V) appliquée entre la pointe tunnel et l'échantillon, la vitesse de balayage (S_r : Scan rate) et le sens de balayage de la pointe. La reproductibilité des images dépend de ces paramètres, de la surface de l'échantillon, de la qualité de la pointe et du milieu environnant dans lequel le balayage de la surface est effectué. Le contrôle de ces paramètres permet à l'STM d'opérer dans de meilleures

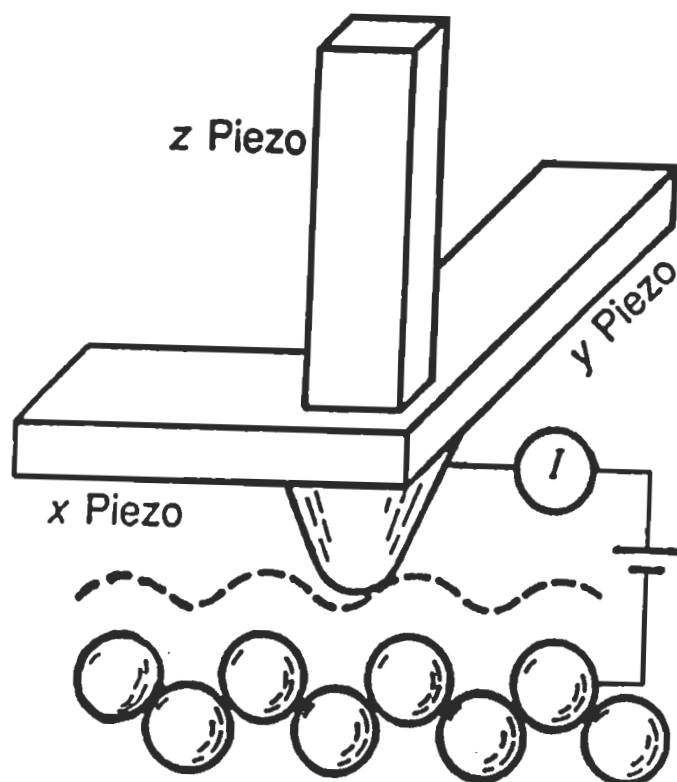


Figure 10. Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope à effet tunnel (STM) (Tiré de Hansma *et al.*, 1988).

conditions. Dans ces conditions, le STM peut atteindre une résolution verticale de l'ordre de 0.01 Å et une résolution latérale de 0.1 Å. En pratique, le STM possède une résolution verticale de l'ordre de 0.1 Å et une résolution latérale de 1 Å.

2.1.3. La pointe STM

2.1.3.1. Technique de préparation de la pointe

La pointe STM, utilisée pour le balayage de la surface des films, est formée par la technique classique d'attaque électrochimique d'un fil de tungstène de 0.25 mm de diamètre. Ce dernier est immergé dans une cellule électrochimique contenant 1 M d'hydroxyde de sodium (Bourque et Leblanc, 1995; Meyer et Amer, 1988; Martin *et al.*, 1987). La cellule est constituée d'une électrode de référence en cuivre et d'une électrode de travail (fil de tungstène). La différence de tension imposée à ces deux électrodes permet le passage de courant électrique (1 A) et le détachement des atomes de tungstènes. Le résultat d'une telle expérience permet la formation d'une pointe fine. Généralement, une pointe idéale serait formée d'un seul atome à son extrémité. La figure 11 montre une vue de la pointe STM prise par le microscope électronique à balayage (SEM: Scanning electron microscope).

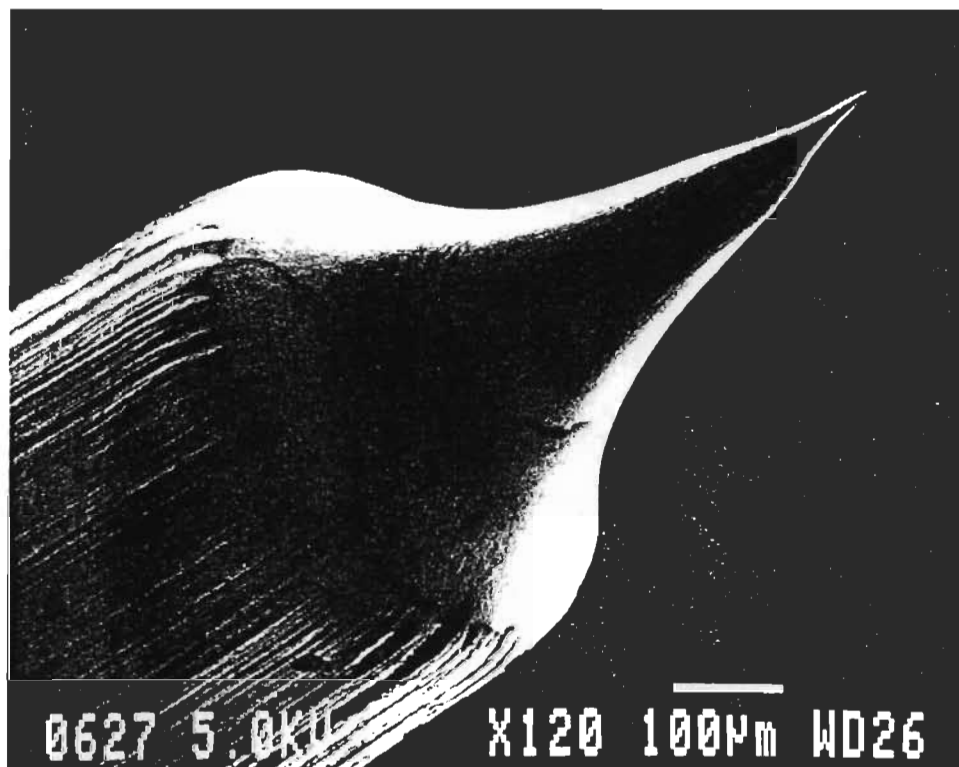


Figure 11. Vue de la pointe STM prise par le microscope électronique à balayage (SEM)
(Tiré de Bourque et Leblanc, 1995).

2.1.3.2. Fonctionnement de la pointe

La pointe est fixée à un élément piézo-électrique constitué de trois barreaux de céramiques (repaire: XYZ). Ces derniers permettent à la pointe d'être pilotée dans les trois directions de l'espace (X,Y et Z) en fonction des tensions appliquées aux éléments piézo-électriques (voir figure 10).

L'enregistrement des variations verticales du courant tunnel [$I_t = f(X,Y)$] en mode hauteur (Z) constante, créées par la pointe dans la direction Z en fonction de sa position latérale (X,Y), fournit une image tridimensionnelle de la structure topographique de la surface du film. Le déplacement de la pointe perpendiculairement à la surface de l'échantillon (balayage parallèle au plan de la surface X,Y) permet de reproduire la topographie de la surface étudiée.

Les films préparés, afin d'être visualisés, doivent être conducteurs et plats au niveau atomique de préférence. D'autre part, les molécules et les atomes doivent avoir une mobilité limitée sur le substrat (adhérence des molécules au substrat). Généralement, le balayage de la surface des films s'effectue en mode distance constante. Dans ce mode, le courant tunnel est maintenu constant lors de la construction de l'image. Le déplacement de la pointe dans la direction Z (en mode courant constant) est asservi par la condition que la densité de courant J est invariable pour une surface donnée. Le pilotage des céramiques piézo-électriques (X,Y et Z) et le contrôle de la position de la pointe

sont effectués par un système très précis commandé par une électronique d'asservissement. Un micro-ordinateur est utilisé pour stocker les données des images.

2.2. Microscopie à force atomique

2.2.1. Principe de base de la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM: Atomic force microscope) est une technique qui nous permet de mesurer le champ de forces entre les atomes de la pointe et ceux de la surface de l'échantillon. Le schéma de base du microscope à force atomique est représenté dans la figure 12.

Contrairement au microscope à effet tunnel, l'AFM ne demande pas des échantillons nécessairement conducteurs (Ogletree et Salmeron, 1990). Son principe de mesure consiste à amener l'échantillon près de la pointe stationnaire, très fine, montée sur un ressort. Celle-ci est attachée à un micro-levier, placée de sorte que son axe principal de symétrie soit perpendiculaire au plan de la surface du film. Le micro-levier sert à communiquer au système de détection tout effet de force sur la pointe. La figure 13 montre une image de la pointe et du micro-levier (Si_3N_4) d'AFM obtenue par le microscope électronique à transmission (TEM). Cette image montre la position de la pointe au-dessus de la surface de l'échantillon (Rugar et Hansma, 1990).

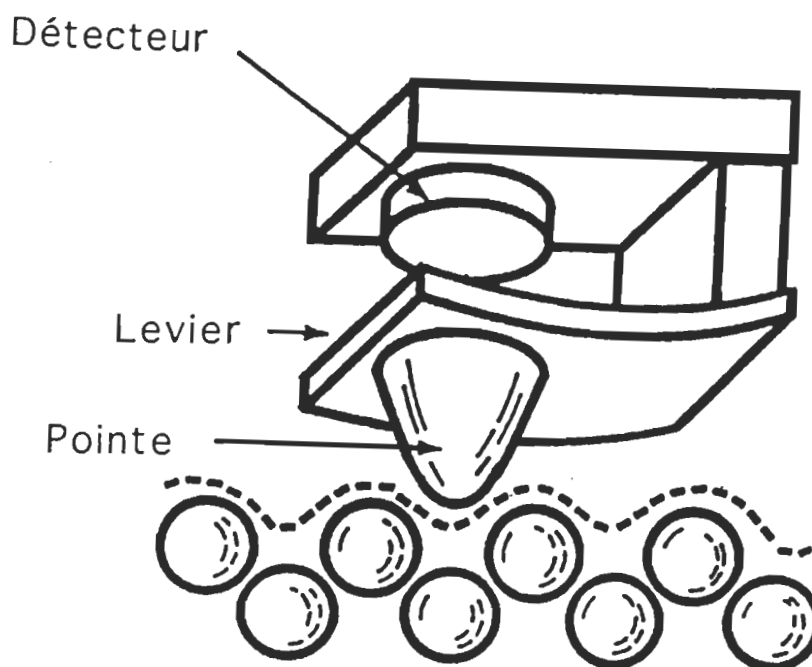


Figure 12. Schéma du principe de fonctionnement du microscope à force atomique (AFM) (Tiré Hansma *et al.*, 1988).

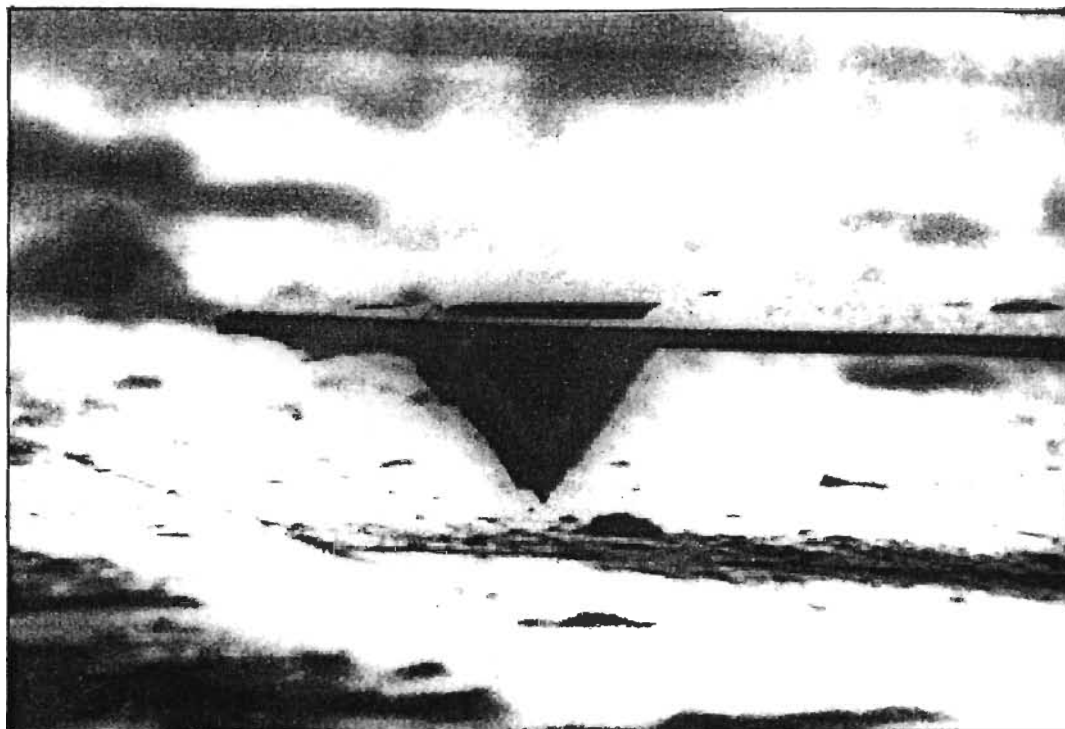


Figure 13. Image de la pointe AFM prise par le microscope électronique à transmission (TEM)
(Tiré de Rugar et Hansma, 1990).

La détection des faibles mouvements verticaux et latéraux du micro-levier lors du balayage de la surface consiste à mesurer la déflexion du faisceau laser, provenant de la diode laser, réfléchi par le micro-levier vers la photodiode. La figure 14, nous donne une représentation schématique du fonctionnement du système de détection par déviation optique.

Au cours du balayage, au fur et à mesure que l'échantillon avance vers la pointe, le micro-levier commence à s'incliner vers la surface de l'échantillon. Ce dernier subit une déformation (courbure) proportionnelle à l'intensité de la force (10^{-9} à 10^{-12} N) en chaque point de la surface balayée, cette information est utilisée pour décrire la topographie de la surface des films.

Comme dans le cas du microscope à effet tunnel, la résolution des images AFM est à l'échelle moléculaire "voire atomique". De plus, l'AFM peut opérer dans différents environnements: en air, sous vide ou en solution (Marti *et al.*, 1987). Il permet l'examen des systèmes biologiques dans leur environnement physiologique (Hansma et Hoh, 1994; Morris, 1994) et peut s'appliquer à tous les types de films L-B (conducteur ou non conducteur). Dès son apparition, l'AFM a été utilisé pour observer la structure cristalline de la surface de matériaux inorganiques comme le graphite (HOPG: Highly Oriented Pyrolytic Graphite), l'or "Au(111)" et le mica (Sugawara *et al.*, 1990; Manne *et al.*, 1990; Drake *et al.*, 1989). En général, la résolution atomique est facilement obtenue pour des surfaces qui ont une architecture moléculaire bien

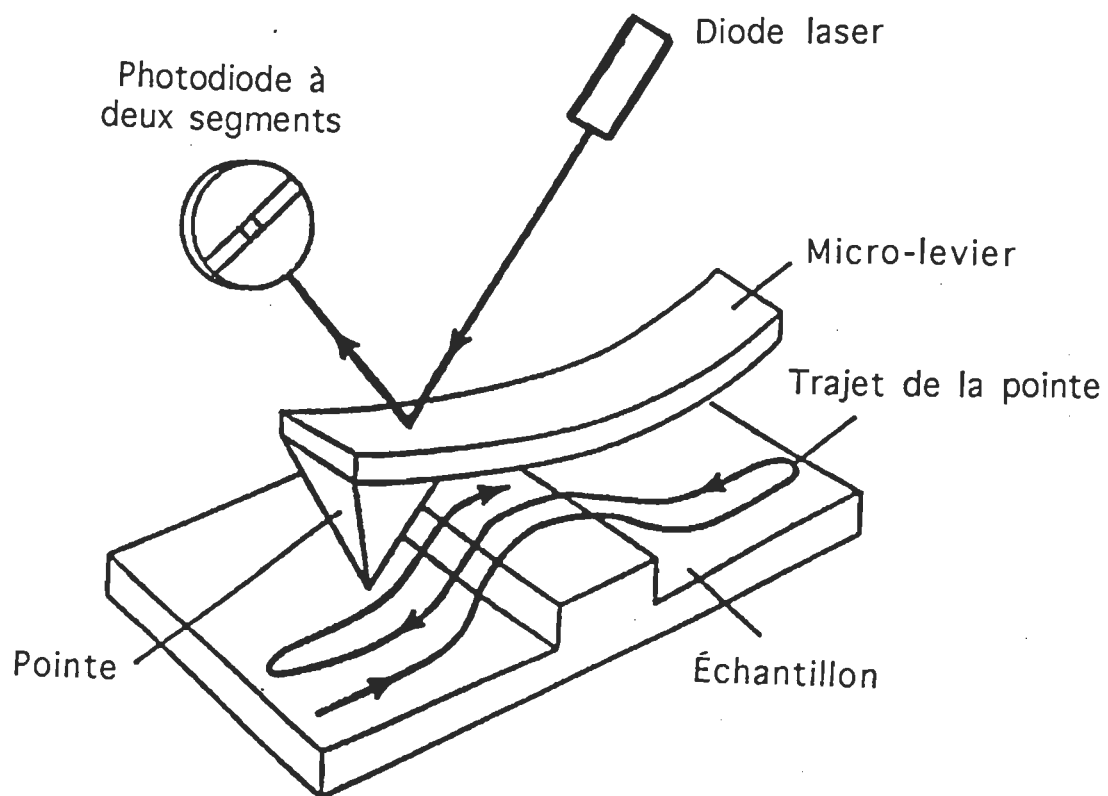


Figure 14. Représentation schématique de fonctionnement du système de détection par déviation optique (Tiré de Roberts *et al.*, 1994).

contrôlée (structure cristalline, plat).

2.2.2. Mode d'opération de l'AFM

2.2.2.1. Type de force entre la pointe et l'échantillon

Le balayage de la surface de l'échantillon tout proche de la pointe permet à ses atomes et à ceux de la pointe d'entrer en interaction. Dans cette situation, les forces qui peuvent exister entre la pointe et l'échantillon sont de type de van der Waals, électrostatiques et/ou magnétiques (Martin *et al.*, 1987).

La figure 15, nous montre la courbe typique de la force (F) qui agit sur le micro-levier en fonction de la distance (Z) séparant la pointe et l'échantillon. Le point A de la courbe correspond à la force (F_A) attractive maximale de van der Waals obtenue au moment où la pointe commence à s'approcher de la surface de l'échantillon (déviations maximale du levier). Le point B correspond au repoussement de la pointe par la surface de l'échantillon. Dans cette position, l'intensité de la force (F_B) est proche de zéro (la force d'attraction est égale à celle de répulsion). La pente de la droite passant par A, B et C décrit les propriétés mécaniques de la surface de l'échantillon à l'échelle nanométrique. Elle dépend de la position de l'échantillon par rapport à la pointe, de la géométrie et de la qualité de la pointe. La courbe passant par les points C et D correspond à la force d'adhésion qui existe entre la pointe et l'échantillon. L'intensité de la force (F_D), au point D, correspond

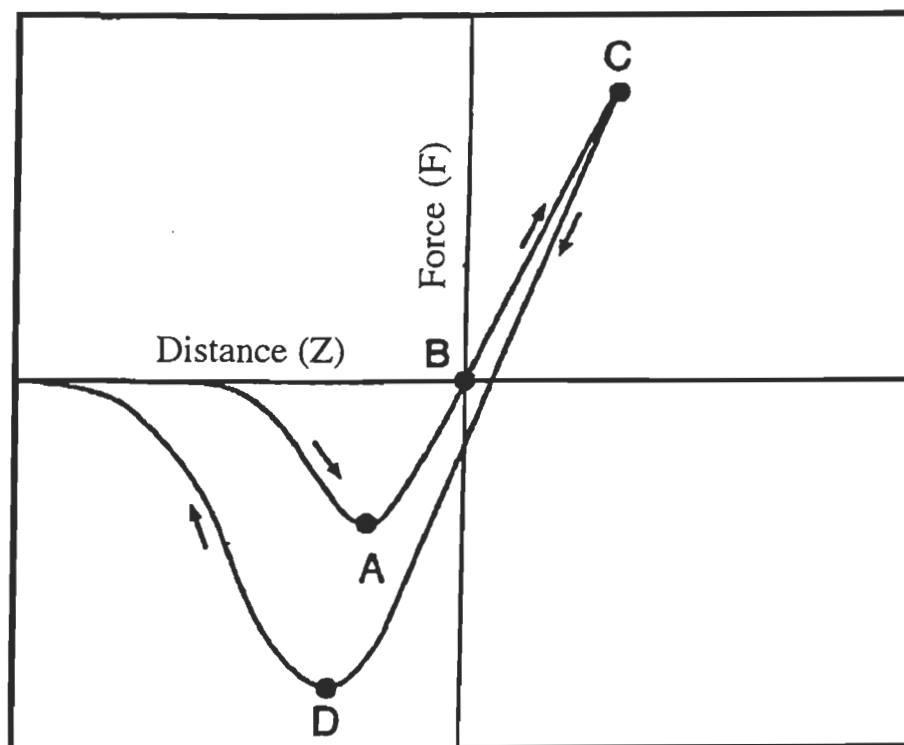


Figure 15. Courbe typique de la force agissant sur le micro-levier en fonction de la distance séparant la pointe et l'échantillon (Tiré de Burnham *et al.*, 1993).

au maximum de la force d'adhésion. La partie de la courbe au-dessous de l'axe des X correspond aux forces attractives de van der Waals qui existent entre la pointe et l'échantillon, alors que celle du haut correspond aux forces répulsives. Notons que toute position de la pointe située après le point A permet au microscope de fonctionner en mode contact, alors que le déplacement de la pointe avant le point A correspond au mode non contact.

La résultante F des forces attractives et répulsives s'exprime selon l'équation suivante:

$$f(Z) = 12 \frac{B}{Z^{13}} - 6 \frac{D}{Z^7}$$

où, B et D sont des constantes qui dépendent de la qualité de la pointe ainsi que de la densité et la distribution de charges à la surface de l'échantillon. Z est la distance entre la pointe et l'échantillon.

La distance nécessaire au bon fonctionnement du microscope varie selon le type de la force. Le tableau 3 nous donne les différentes forces qui peuvent exister entre la pointe et l'échantillon (Burnham *et al.*, 1993).

2.2.2.2. Mode contact et non contact

La microscopie AFM fonctionne généralement en mode appelé "contact". Dans ce mode, la distance (Z) séparant la pointe et l'échantillon devient très petite. Dans ce cas, l'équation ci-dessus est dominée par le premier terme ($12 B/Z^{13}$) correspondant aux forces répulsives. Une fois le contact établi, les forces répulsives (10^{-10} à 10^{-7} N) provoquées par le contact entre les nuages électroniques des atomes de la pointe et ceux de la surface de l'échantillon tendent à repousser la pointe vers le haut. Le balayage de la pointe AFM tout proche de la surface de l'échantillon s'effectue en mode force constante. L'intensité des forces répulsives est maintenue constante lors de la construction de l'image décrivant la topographie de la surface de l'échantillon.

L'AFM peut aussi fonctionner en mode appelé "non contact". Le balayage de la surface de l'échantillon s'effectue en mode hauteur constante. La distance entre la pointe et l'échantillon est inférieure ou égale à 100 nm. Les forces qui agissent sur la pointe peuvent être de type de van der Waals, électrostatiques et/ou magnétiques (Hartmann, 1991). Généralement ces forces sont attractives et parfois elles sont répulsives. Dans ce mode, l'intensité des forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon varie entre 10^{-12} et 10^{-10} N.

Dans les deux modes de fonctionnement, le principal problème reste de ne pas endommager la surface de l'échantillon, de la pointe

Tableau 3

Type de forces existant entre la pointe et l'échantillon.

Type de force	Distance pointe-échantillon en Angströms (Å)
van der Waals (attraction)	~100
Électrostatique (répulsion)	~1000
Capillaire (condensation)	~10
Hydratation (sels)	—
Solvatation (solvant)	~100
Friction (balayage)	—
Adhésion (contact)	~10

(Tiré de Burnham *et al.*, 1993)

ou des deux simultanément. Afin d'éviter ce problème, il est nécessaire de bien contrôler la distance (Z) pointe-échantillon. La résolution du microscope dépend grandement du mode de fonctionnement, de la vitesse de balayage (S_r) et de l'intensité de la force (F). Cette dernière dépend de la permittivité diélectrique de la pointe et de la surface de l'échantillon (Hartmann, 1991).

Il est clair que dans les deux types de microscope, STM et AFM, l'intérêt réside dans la visualisation des objets à l'échelle moléculaire. L'utilisation de ces deux récentes techniques pour la caractérisation des films L-B devrait aider à comprendre l'organisation exacte des molécules dans un plan moléculaire et les propriétés particulières qui en découlent. Une comparaison directe des structures obtenues, à l'aide de ces deux techniques, permettrait de justifier la structure topographique des films visualisés.

2.3. Types de substrats utilisés pour l'STM et l'AFM

L'examen de la topographie de la surface des films L-B par STM et AFM dépend largement de la nature du substrat utilisé et de la pureté de l'échantillon. Les substrats les plus utilisés et qui ont fait l'objet de plusieurs études par STM et AFM sont le graphite, le mica et l'Au (111).

Le graphite (HOPG: graphite pyrolitique hautement orienté) peut être utilisé comme substrat hydrophobe pour l'STM et l'AFM. Il

est très plat sur de larges surfaces et très facile à nettoyer par la méthode de clivage à l'aide d'une bande adhésive ou d'une lame aiguë. Il est assez conducteur, non corrosif et relativement propre et inerte.

Le mica comme l'HOPG, se nettoie facilement par une bande adhésive ou une lame aiguë. Il est plat sur de larges surfaces et relativement propre et stable en air ou en solution. Contrairement à l'HOPG, le mica est un substrat hydrophile et non conducteur ce qui fait de lui un candidat très utile pour l'AFM.

L'Au (111) peut aussi être utilisé comme substrat hydrophile pour l'STM et l'AFM. La technique pour sa préparation consiste à évaporer l'Au sur des surfaces de mica chauffé sous vide et préalablement nettoyé par la méthode de clivage. La déposition des atomes Au sur la surface du mica (001) entraîne une bonne orientation des films Au dans la direction (111), formant ainsi un arrangement epitaxial. Les films préparés par cette technique ont une surface hydrophile, propre et conductrice. Ils sont non corrosifs, chimiquement inertes et possèdent une épaisseur de l'ordre de 300 nm (DeRose *et al.*, 1991; DeRose *et al.*, 1993). Après leur production, les substrats doivent être placés sous vide dans un dessiccateur jusqu'à leur utilisation.

CHAPITRE 3

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Matériels

3.1.1. Pureté des produits utilisés

La technique des monocouches est très sensible aux impuretés des produits servant à préparer la phase aqueuse et des molécules étalées à l'interface. Afin d'éviter tout effet d'impureté qui pourrait fausser la mesure des isothermes Π -A et ΔV -A, ainsi que la préparation des films L-B, les substances utilisées doivent être d'un haut degré de pureté: la verrerie, la cuve de Langmuir, les solvants d'étalement, ainsi que l'eau et les sels constituant la sous-phase.

3.1.2. Purification de l'eau et des sels de la sous-phase

L'eau servant à la préparation de la sous-phase et des solutions aqueuses est filtrée à l'aide d'un système nanopore

(Sybron-Barnstead, Boston, MA) comportant quatre filtres. L'eau permutée est passée à travers des résines échangeurs d'ions et une membrane dont le diamètre excède 0.2 mm. L'eau ainsi filtrée, présente une résistivité électrique de l'ordre de 18 M Ω .cm.

Dans certains cas, cette eau subit une double distillation sur des colonnes de quartz (modèle bi-18, Heraeus, Hanau, Allemagne). Suite à la distillation, la tension superficielle de l'eau, déterminée par la méthode de Nouy, est ≥ 71 mN m⁻¹. Finalement, l'eau est conservée dans des bouteilles de verre propres jusqu'à son utilisation pour la préparation des monocouches.

Le Trizma-base (tri[hydroxymethyl]aminomethane, C₄H₁₁NO₃) servant à la préparation de la sous-phase, le phosphate dibasique (Na₂HPO₄) de même que le phosphate monobasique (NaH₂PO₄) servant à l'ajustement du pH des solutions protéiques proviennent de la compagnie Sigma (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

L'adsorption d'impuretés tensioactives à l'interface air-eau pourrait fausser la mesure des isothermes mesurées et modifier les interactions prenant place dans la monocouche. La pureté de l'eau et des sels de la sous-phase a été détectée par des mesures de compressions à balayage rapide " test blanc". Pour ce faire, suite au remplissage du bassin de Langmuir par la solution tamponnée et après un temps d'attente de 30 minutes, aucune pression de surface n'a été détectée lors de la compression en blanc. Pour cette raison, et puisque le degré de pureté réclamé par le fabricant est de

99.9%, le Trizma base et le phosphate sont utilisés sans purification supplémentaire.

3.1.3. Pureté des molécules utilisées en monocouche

Le cyt *f*, extrait de navet selon la méthode de Gray (Gray, 1978; Gray, 1992), est reçu sous forme de poudre en lots de 5 mg (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Le degré de pureté de la protéine est vérifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Laemmli, 1970) en présence du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE molecular weight standards, low range). L'isolation du cyt *f* sur gel de polyacrylamide ne montrent aucune trace d'impureté provenant des lots examinés. Les résultats de densitométrie (figure 16) démontre qu'il n'y a qu'une seule protéine et qu'il s'agit du bon poids moléculaire du cyt *f* (31.1 KD). De plus, suite à l'étalement de la protéine à la surface de la sous-phase, aucune prssion de surface (provenant d'impuretés tensioactives) n'a été détectée avant la compression de la monocouche. La protéine est utilisée telle que fournie par la compagnie Sigma, sans aucune autre purification.

Le MGDG et le DGDG, proviennent de la compagnie Lipid Products (Nutfield Nurseries, Surrey, U.K.) et Serdary Research Lab. Inc. (London, ON, Canada). Ces lipides sont constitués de chaînes poly-insaturées riche en acide linoléique (C16:3 et C18:3). Les échantillons sont reçus en lots de 100 mg dans un mélange de chloroforme:méthanol (9:1, v:v) à une concentration de 1 mg/ml. Les

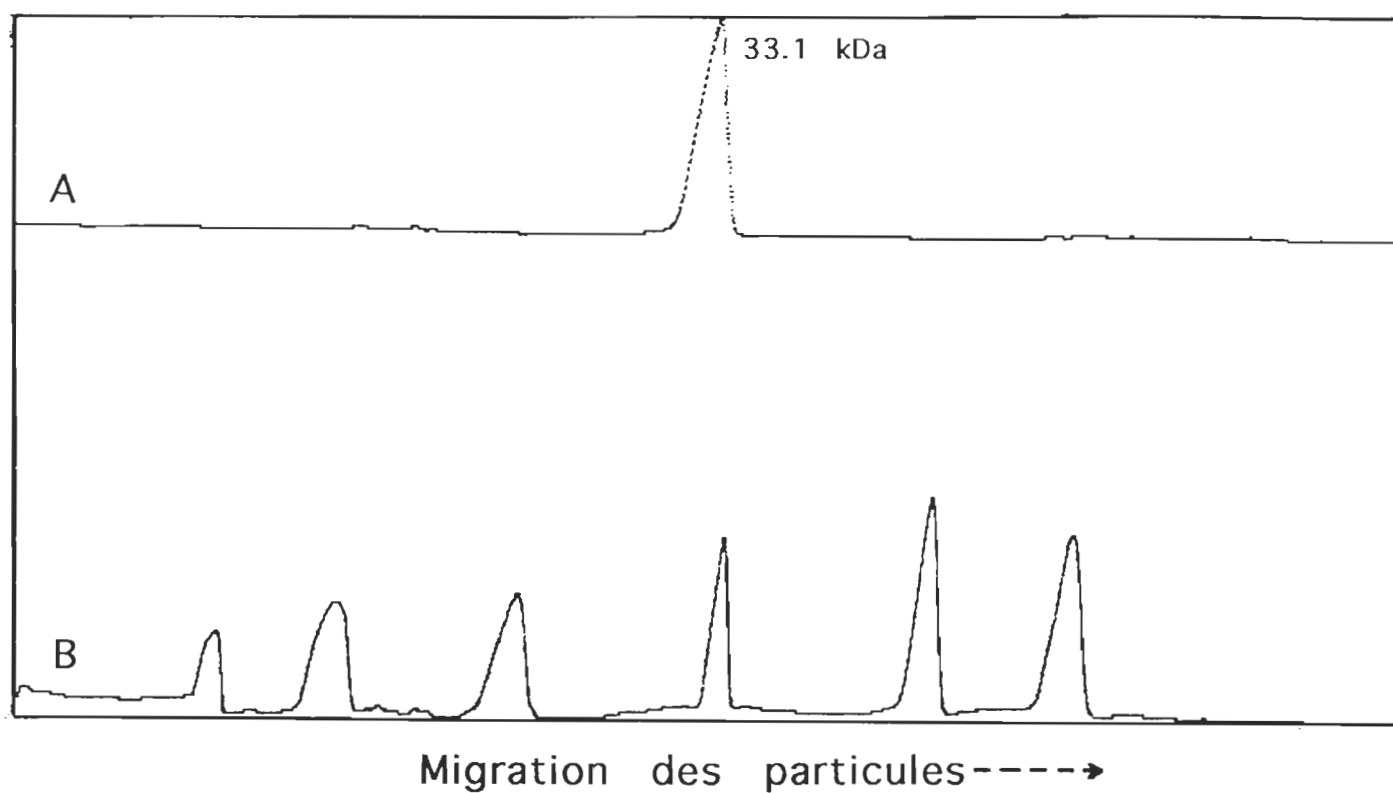


Figure 16. Densitogramme électrophorétique représentant l'isolation du cyt *f* sur gel de polyacrylamide. (A): Représente l'isolation du cyt *f*. (B): Représente la migration du standard.

tests chromatographiques (Chromatographie sur couche mince: CCM) effectués sur ces lipides n'ont pas révélé d'impureté pouvant altérer les isothermes Π -A obtenues (Tancredi et al., 1981; Tancredi et al., 1982; Gallant, 1990). Pour cette raison, les deux lipides sont utilisés tels que fournis par le fabricant (purs à 99%) sans purification préalable.

L'acide arachidique C_{20} (n-eicosanoic acid, $C_{20}H_{40}O_2$, pur à 99%), provient de la compagnie Sigma, est utilisé en monocouche pour la modification des substrats rugueux.

3.1.4. Les solvants d'étalement

L'éthanol, le chloroforme et le méthanol sont utilisés comme solvants d'étalement des molécules, puisqu'ils s'étalent, s'évaporent rapidement et sont très peu miscibles dans l'eau (forment un mélange homogène). Chaque solvant est préalablement distillé dans un système approprié.

3.2. Méthodes

3.2.1. Technique de fabrication de la monocouche à l'interface air/eau

L'épandage d'une protéine ou de molécules lipidiques amphiphiles à la surface d'une solution aqueuse conduit à la formation d'une couche monomoléculaire, ayant une structure

bidimensionnelle bien ordonnée. Les molécules étalées, seront orientées de telle sorte que les segments polaires ou hydrophiles plongent dans l'eau, tandis que les segments non polaires hydrophobes s'orientent vers l'air. Le Cyt *f* est déposé à partir d'une solution d'éthanol:eau préparée en solubilisant d'abord le Cyt *f* dans l'eau et en ajoutant ensuite l'éthanol. Le MGDG et le DGDG sont déposés à partir d'une solution chloroforme:méthanol (9:1, v:v). Le nombre de particules épandues à l'interface est calculé de façon à obtenir une aire par molécule. Avant le début de la compression, une attente de 30 minutes est nécessaire pour permettre au solvant d'étalement de s'évaporer. Lorsque le film monomoléculaire est comprimé au maximum, chaque molécule occupe une surface bien déterminée.

3.2.2. Préparation des films mixtes

La procédure expérimentale pour préparer les films mixtes lipide-protéine est représentée sur la figure 17-A. La correspondance entre les étapes expérimentales et la présentation graphique des isothermes de pression de surface est montrée sur la figure 17-B. La solution de lipide est déposée goutte-à-goutte sur la surface aqueuse préalablement nettoyée (étape 1). Après une attente de 30 minutes permettant au solvant d'étalement (chloroforme:méthanol) de s'évaporer, la protéine est étalée à la surface de la sous-phase (étape 2). Après évaporation du solvant (l'éthanol), le film mixte est comprimé jusqu'au collapse (étape 3).

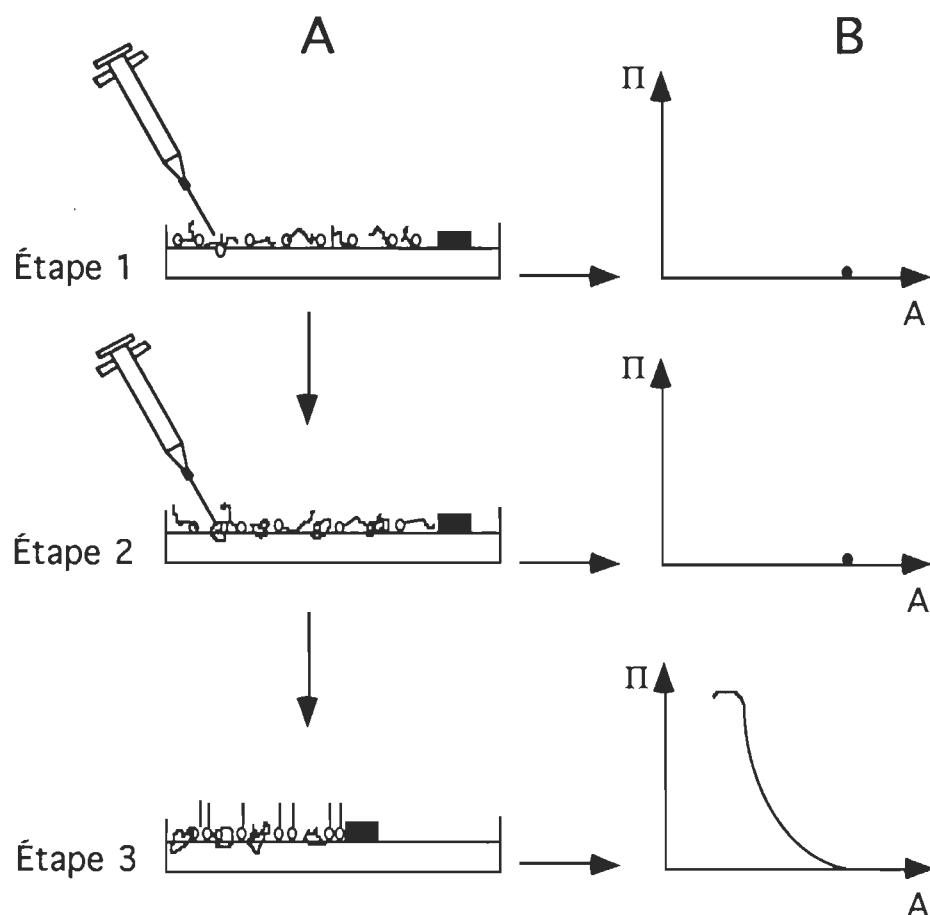


Figure 17. Représentation schématique de la procédure expérimentale pour préparer les films mixtes lipide-protéine (A) et de la correspondance avec les isothermes Π -A (B).

3.2.3. La cuve: "bain de Langmuir"

La cuve servant à mesurer les isothermes Π -A et ΔV -A est illustrée à la figure 18. Le bassin de la cuve est fait d'aluminium, les parois intérieures sont recouvertes d'un matériau hydrophobe (Téflon), inerte chimiquement. Il est possible de le remplir de telle sorte à ce que le ménisque de l'eau soit au-dessus des bords de la cuve. C'est dans le compartiment B (voir figure 18), compris entre le flotteur et la barrière mobile, que nous étalons les molécules. En déplaçant la barrière, la surface disponible pour les molécules étalées diminue au fur et à mesure que la pression augmente.

L'ensemble des expériences effectuées dans cette étude a été réalisé à la fois, au Centre de recherche de l'Université du Québec à Trois-Rivières (U.Q.T.R) et au département de chimie de l'Université de Miami. Deux types de bassin ont été utilisés, le premier "cuve de Langmuir" possède une dimension de 102,0 x 14.7 x 1,0 cm. Le second "balance de Wilhelmy", ayant une dimension de 58.0 x 15.5 x 1,0 cm, comporte un puits de 4,0 cm de profondeur permettant la plongée du substrat au moment du transfert de la monocouche. Les résultats ainsi obtenus restent toutefois identiques et reproductibles.

L'ensemble des expériences effectuées dans cette étude a été réalisé à la fois, au Centre de recherche de l'Université du Québec à Trois-Rivières (U.Q.T.R) et au département de chimie de l'Université de Miami. Deux types de bassin ont été utilisés, le premier "cuve de

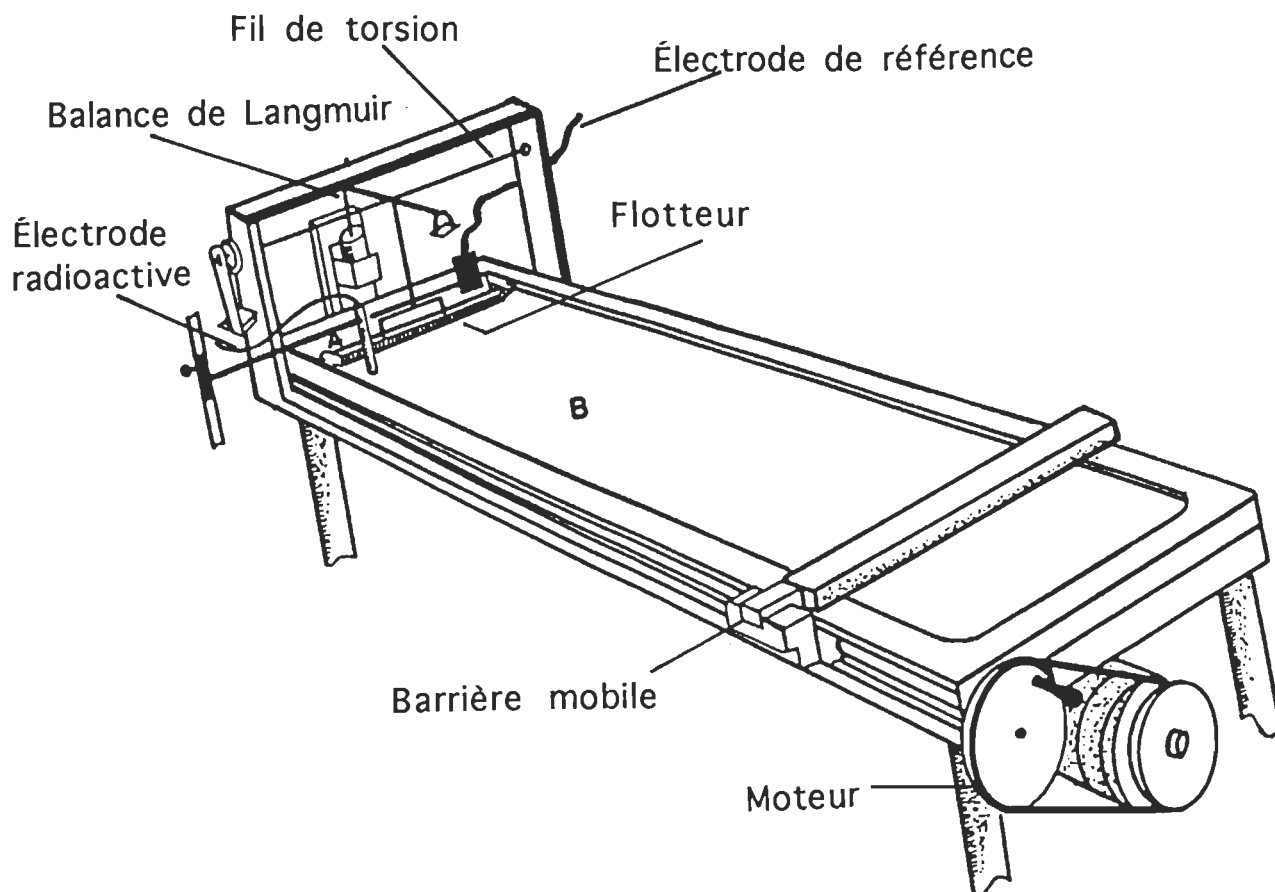


Figure 18. Représentation schématique de la cuve de Langmuir servant à mesurer les isothermes Π -A et ΔV -A. Les détails sont donnés dans le texte.

Langmuir" possède une dimension de 102,0 x 14.7 x 1,0 cm. Le second "balance de Wilhelmy", ayant une dimension de 58.0 x 15.5 x 1,0 cm, comporte un puits de 4,0 cm de profondeur permettant la plongée du substrat au moment du transfert de la monocouche. Les résultats ainsi obtenus restent toutefois identiques et reproductibles.

3.2.4. Mesure de la pression de surface

La mesure de la pression de surface est à la base de l'identification et de la caractérisation des monocouches. Cette mesure peut nous informer sur la stabilité de la monocouche à l'interface air-eau, la réorientation des molécules dans un système à deux dimensions, les transitions de phase et les changements de conformation. Généralement, la mesure quantitative de la pression superficielle s'effectue par deux méthodes classiques: la méthode de Wilhelmy et de Langmuir.

3.2.4.1. Méthode de Wilhelmy

L'utilisation de la balance de Wilhelmy consiste à mesurer la force verticale due à la tension de surface exercée sur une lame mouillable (platine ou feuille de papier filtre) suspendue et partiellement immergée dans la sous-phase, pour une surface propre (eau pure), puis en présence de la monocouche.

3.2.4.2. Méthode de Langmuir

Le dispositif expérimental (voir figure 18) est constitué d'un flotteur (une mince bande flexible en Téflon) relié à une balance par l'intermédiaire d'un fil de torsion. Le flotteur sépare la surface aqueuse en deux parties. La première (partie A) contient uniquement la sous-phase. La deuxième (partie B), quant à elle, comporte la monocouche. La pression de surface (Π) se définit comme étant la différence entre les tensions superficielles de la sous-phase pure (d_0) et du film monomoléculaire (d) répandue sur la surface de l'eau. Cette différence est à l'origine de la force horizontale exercée par le film sur le flotteur, mesurée par le système de Langmuir et enregistrée grâce au déplacement du flotteur relié au fil de torsion (voir figure 18). Elle est exprimée par la relation suivante:

$$\Pi = d_0 - d$$

3.2.5. Le potentiel de surface

La mesure du potentiel de surface est une technique importante pour l'analyse des propriétés de la distribution des groupes polaires par rapport aux groupes non polaires de la monocouche. En assimilant la monocouche à un condensateur plan dont les faces parallèles sont l'air et la phase près de la surface de l'eau, on définit le potentiel de surface comme étant la différence de potentiel (ΔV) entre une électrode de référence (Pt ou calomel)

et une électrode radioactive placée juste au-dessus de la surface de l'eau (1 à 2 mm au-dessus de l'interface). La première est plongée dans la sous-phase, préalablement nettoyée (brûlée au rouge). La seconde, étant radioactive, permet d'ioniser la couche d'air qui la sépare du film et la rendre ainsi conductrice. Le potentiel de surface s'exprime par l'équation suivante:

$$\Delta V = V_m - V_o$$

où V_o est la différence de potentiel mesurée en absence de la monocouche, par rapport à l'électrode de référence. V_m est la différence de potentiel en présence de la monocouche.

Le potentiel ΔV représente l'augmentation du potentiel à l'interface par la présence d'une couche monomoléculaire insoluble (Gaines, 1966). Il est directement relié au moment dipolaire moyen de la monocouche et dépend de la densité ainsi que de l'orientation des molécules dans le film. L'équation suivante nous donne son expression en fonction du moment dipolaire:

$$\mu_{\perp} = \frac{A \Delta V}{12\Pi}$$

où μ_{\perp} est la composante du moment dipolaire moyen de la monocouche (perpendiculaire à l'interface), exprimée en millidebyes (mD). A est l'aire occupée par molécule en \AA^2 . ΔV est le potentiel de surface mesuré en millivolts (mV). Π est la pression de surface, exprimée en mN/m.

3.2.6. L'isotherme de pression de surface (Π -A)

Les isothermes de pression de surface Π -A représentent la pression de surface (Π) de la monocouche en fonction de l'aire moléculaire (A) occupée par chaque molécule. La diminution de l'aire globale occupée par les molécules permet de faire varier l'aire moléculaire. Chaque point de l'isotherme représente un état stationnaire de la monocouche qui peut se trouver dans différentes phases (gaz, Liquide Expansé: LE, Liquide Condensé: LC ou solide).

La phase gazeuse est observée dans la région de grandes aires moléculaires. Les molécules subissent entre elles des chocs élastiques aléatoires. Dans la phase liquide, les molécules interagissent par l'intermédiaire de leurs chaînes aliphatiques (forces de van der Waals), il n'y a alors aucun ordre d'orientation à grande distance. Dans la phase solide, les têtes polaires sont orientées par les liaisons hydrogènes. Le "collapse" est un état instable de la monocouche qui dépend de la nature des molécules utilisées, de la température, du pH de la sous-phase et de la vitesse de compression. La pression au collapse (Π_c) correspond au changement de pente de l'isotherme à la fin de la portion linéaire observée dans la région des pressions élevées.

La figure 19 représente l'isotherme Π -A d'une substance amphiphile, ainsi que les différents états de phase de la monocouche au cours de la compression (Gaines, 1966). Ce type d'isotherme présente une propriété physique spécifique de chaque

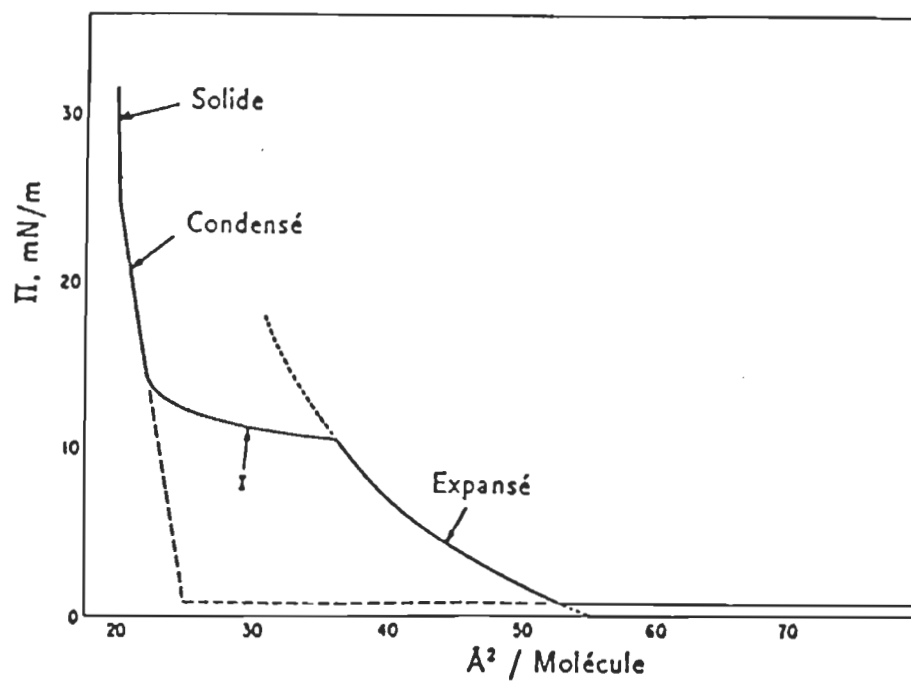


Figure 19. Isotherme Π -A d'une substance amphiphile, montrant les différents états de phase de la monocouche au cours de la compression (Tiré de Gaines, 1966).

type de molécule amphiphile étalée à la surface de la sous-phase. Il offre des informations précieuses sur l'orientation des molécules et leur interaction dans une monocouche.

3.3. Les films de Langmuir-Blodgett (L-B)

3.3.1. Le transfert sur substrat solide

Le film monomoléculaire étalé à la surface de la sous-phase peut être transféré sur un substrat solide dans le but d'études spectroscopiques, microscopiques ou d'applications techniques. La procédure expérimentale de la déposition des monocouches sur substrat solide hydrophile est illustrée à la figure 20. Les principaux auteurs de cette technique de déposition sont "Langmuir et Blodgett"; ce sont les premiers qui ont réussi à transférer la monocouche sur substrat solide afin de la caractériser. Le dépôt ne peut avoir lieu que si la monocouche a une affinité plus forte pour le substrat que pour la sous-phase. Le transfert étant parfois une opération de longue durée, la stabilité de la monocouche au cours du temps joue un rôle important. La pression de transfert doit être choisie de telle sorte que la monocouche doit se trouver dans une phase condensée (LC) inférieure de quelques mN/m à la pression de collapse.

Le transfert de la monocouche est une étape très importante dans la fabrication des films L-B. Il dépend de plusieurs paramètres tels que la nature de la monocouche (stabilité, qualité

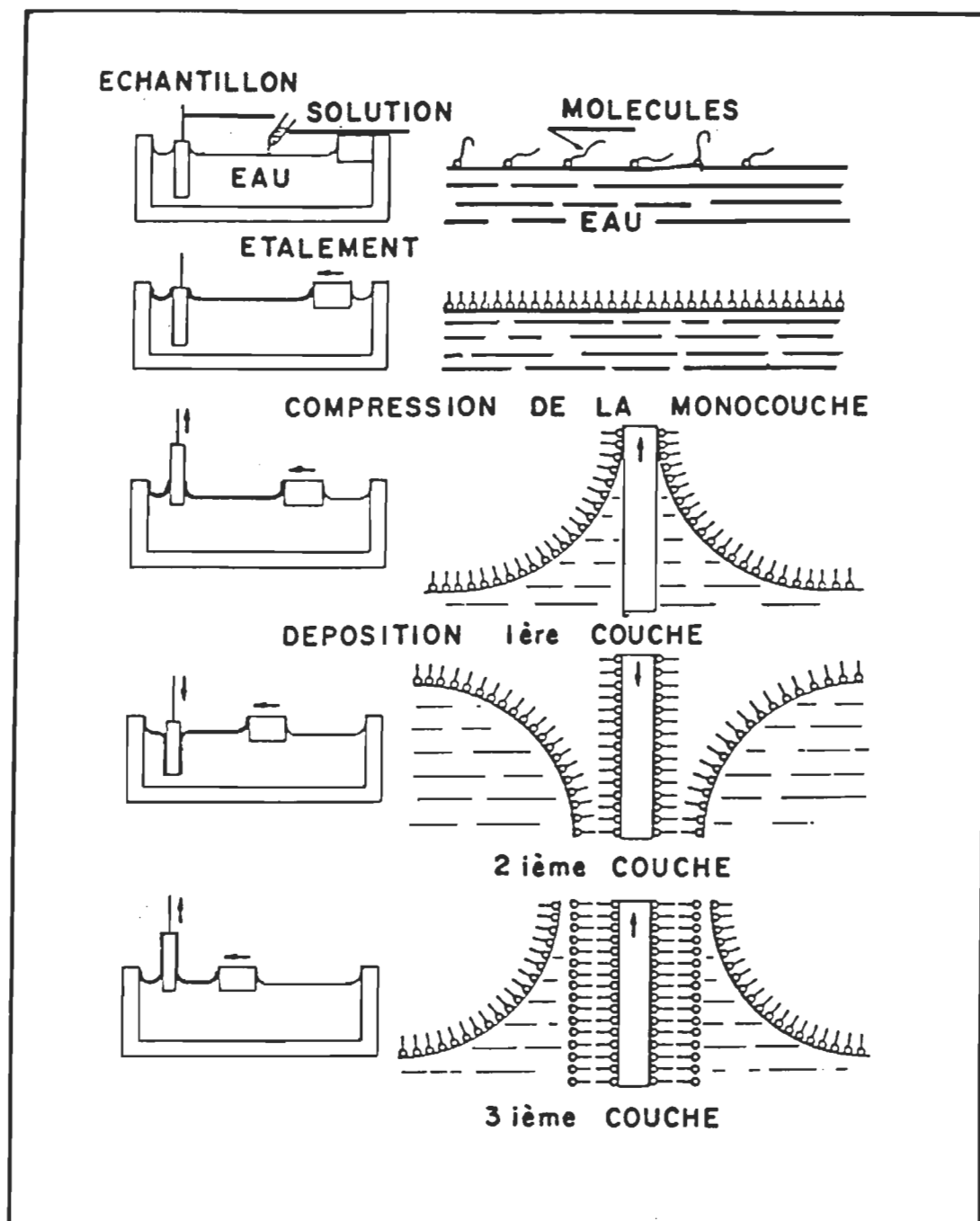


Figure 20. Séquence de déposition des monocouches (Tiré de Barraud, 1987).

et homogénéité), la sous-phase (pureté, force ionique, pH et température), la nature du substrat solide (qualité de surface, composition chimique), l'angle de pénétration du substrat dans la sous-phase ainsi que la vitesse de la montée et de la descente du substrat. Cette dernière doit être lente, approximativement de quelques millimètres par minute. La technique de la chimie de surface est aussi très sensible aux effets d'impureté: les solvants de déposition, l'eau, les sels constituant le substrat de la monocouche, la verrerie et la propreté de la cuve. De plus, toutes les substances utilisées à cette fin doivent être d'un haut degré de pureté afin d'augmenter la qualité du transfert de la monocouche.

Le rendement de la déposition peut être déterminé en calculant le rapport entre la surface balayée par la barrière mobile et l'aire occupée par la monocouche sur les faces de la lamelle. Ce rapport est défini par l'équation suivante:

$$T = \frac{A_b}{A_f}$$

où A_b est la surface occupée par les molécules transférées, A_f est la surface immergée du substrat au cours du transfert.

Ce rapport peut nous informer sur la qualité du transfert. Idéalement, ce dernier doit être égal à 1, ce qui prouve que toutes les molécules transférées de la surface de l'eau sont nécessairement déposées sur les faces du substrat.

3.3.2. Les différents types de transfert

Il existe différents types d'empilement possibles (type X,Y,Z) lors du transfert sur substrat solide hydrophile (figure 21). Ces derniers dépendent de la structure et de l'indice d'hydrophobicité des molécules utilisées. Le type X correspond au transfert de la monocouche lors de l'immersion du substrat. Dans ce cas, les multicouches transférées sont moins stables à cause des interactions hydrophiles-hydrophobes entre les couches. Ce type de transfert n'est obtenu qu'avec des molécules possédant un groupe polaire très faible. Le type Y se réalise lorsque les multicouches sont déposées à l'immersion ainsi qu'à l'émersion du substrat dans la sous-phase. Ce genre d'empilement est très stable grâce aux interactions hydrophobes-hydrophobes et hydrophiles-hydrophiles entre les couches transférées simultanément. Ce type de transfert est réalisé avec des molécules possédant des groupements fortement polaires et des chaînes aliphatiques hydrophobes. Par ailleurs, le type Z correspond au transfert de la monocouche sur le substrat lors de son émersion. Contrairement au type Y, les multicouches transférées par le type Z ne sont pas très stables à cause des interactions hydrophiles-hydrophobes qui existent entre les couches.

Le balayage de la surface des films L-B de cyt *f* et de mélange MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f* ainsi que la prise des images STM et AFM sont réalisés à l'aide du microscope Nanoscope II, fabriqué par la compagnie Digital Instrument Inc. (CA, USA). Ce dernier comprend

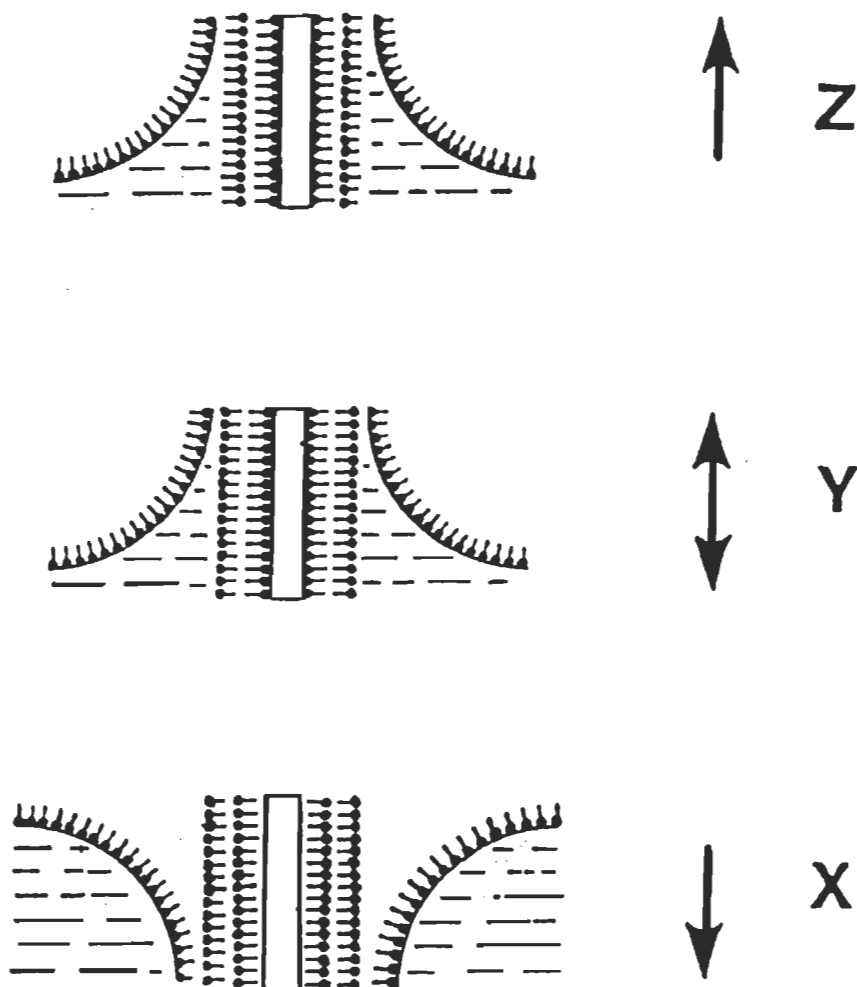


Figure 21. Les différents types de transfert sur substrat solide (Tiré de Barraud, 1987).

les deux types de microscopes (STM et AFM). Les détails sur le principe de fonctionnement de l'STM et de l'AFM sont présentés dans le chapitre 2. Notons aussi que la préparation des films L-B et la visualisation de leurs surfaces sont effectuées dans une salle propre (classe 1000). La température et le taux d'humidité sont maintenus constant à 21 ± 1 °C et 40%, respectivement. À chaque expérience, nous préparons 5 fois le même type de film pour s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus par les deux microscopes (STM et AFM).

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Caractérisation des isothermes Π -A et ΔV -A du cyt f à l'interface air/eau:

Les paramètres critiques qui affectent la désorption d'une protéine de la monocouche à la sous-phase sont: la concentration interfaciale initiale, le solvant d'étalement et le pH de la sous-phase. Le contrôle de ces paramètres permet de caractériser la monocouche de cyt f en mesurant les propriétés de pression de surface (Π) et du potentiel de surface (ΔV) en fonction de l'aire moléculaire (A).

4.1.1. Effet de la concentration interfaciale du cyt f sur les isothermes Π -A et ΔV -A

L'effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt f est illustré dans la figure 22. La protéine est déposée à partir d'une solution aqueuse contenant 20%

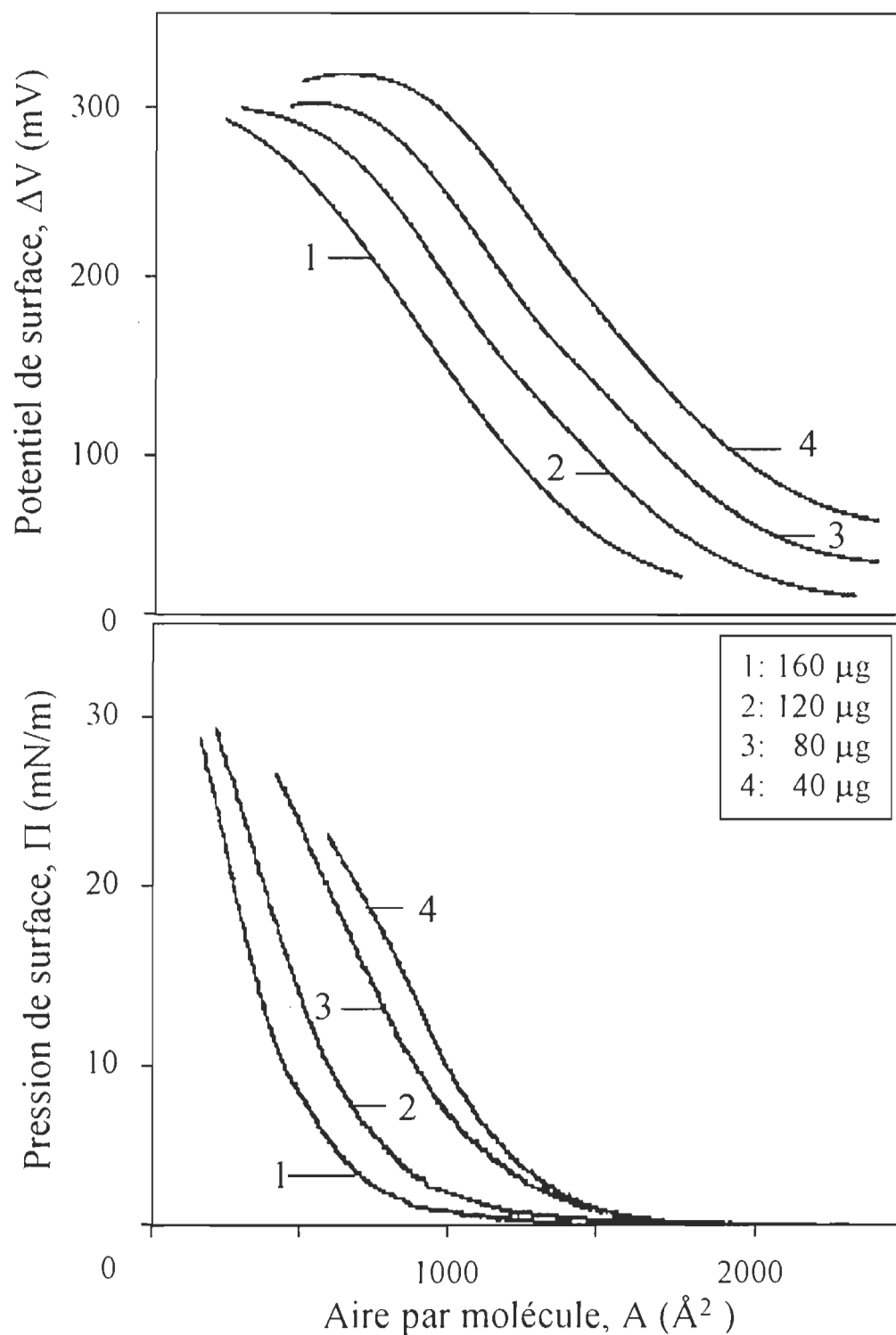


Figure 22. Effet de la concentration interfaciale initiale sur les isothermes Π - A et ΔV - A du cyt f . Les quantités déposées sont indiquées dans la figure. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

d'éthanol (courbes 1-4). Les quantités de cyt *f* déposées sont de 160 μg (courbe 1), 120 μg (courbe 2), 80 μg (courbe 3) et 40 μg (courbe 4). La sous-phase est constituée du tampon Tris-HCl 1 mM, pH: 8. Après un temps d'attente de 30 min., temps nécessaire à l'évaporation du solvant d'étalement, le film est comprimé très lentement à une vitesse d'environ 4 \AA^2 molécule⁻¹ minute⁻¹. Les isothermes Π -A et ΔV -A ainsi réalisées sont des moyennes de quatre courbes obtenues à partir de trois solutions différentes, préparées dans les mêmes conditions. La déviation maximale entre les courbes moyennes extrêmes est de 2 \AA^2 /molécule pour l'aire moléculaire, et de 10 mV pour le potentiel de surface. La figure 22 montre qu'au fur et à mesure que la quantité de cyt *f* déposée augmente, de 40 à 160 μg successivement, l'aire moléculaire extrapolée à 0 mN/m dans la portion linéaire de la courbe diminue de 1 300 \AA^2 (courbe 4) à 580 \AA^2 (courbe 1). Le changement de pente, relativement apparent, observé au sommet de la partie linéaire des isothermes Π -A et ΔV -A correspond à une pression de surface de l'ordre de 18 mN/m et à un potentiel de surface de l'ordre de 290 mV (courbe 4). Ce dernier est défini comme étant le collapse de la monocouche du cyt *f* et correspond à une aire moléculaire de l'ordre de 740 \AA^2 /molécule (courbe 4). L'apparition du collapse est considéré comme étant le commencement d'une désorption partielle de la protéine ou des résidus d'acides aminés, de la monocouche à la sous-phase (MacRitchie, 1985).

Lorsque la monocouche de cyt *f* est dans un état initial ($\Pi=0$), les molécules sont éparses et les dipôles ne sont pas alignés. Dans

ce cas, le potentiel mesuré est celui de la sous-phase, ΔV est faible car les dipôles sont éloignés et peu orientés par rapport à la perpendiculaire (courbe 1 et 2). L'arrangement simultané des molécules de cyt *f* pour former une autre phase (condensée: solide ou liquide) implique une diminution de l'aire moléculaire limite et une augmentation du potentiel de surface. En effet, les molécules s'organisent de plus en plus à l'interface et la contribution des moments dipolaires à la mesure de ΔV est de plus en plus importante. Comme le potentiel de surface dépend de l'orientation perpendiculaire du moment dipolaire, la variation de ce dernier suggère que les changements observés dans les isothermes Π -A et ΔV -A par rapport à l'aire moléculaire sont dus à une plus grande rétention du cyt *f* à la surface de la sous-phase, provoquée par l'effet de la concentration interfaciale.

Les travaux antérieurs effectués sur l'épandage des protéines à l'interface air/eau ont montré qu'une protéine totalement étalée à l'interface air/eau occupe souvent une aire moléculaire de $1 \text{ m}^2/\text{mg}$ (Kashiwagi, 1959; MacRitchie et Ter-Minassian-Saraga, 1984; Krebs *et al.*, 1988; Kézdy, 1972; Taneva *et al.*, 1984;). Afin de limiter les pertes des molécules dans la sous-phase, il est préférable de déposer la moitié de cette quantité, soit $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$. Dans notre cas, la surface de la cuve utilisée est de 900 cm^2 , la concentration interfaciale initiale devrait être de l'ordre de $45 \text{ } \mu\text{g}$. Lorsqu'on examine les résultats de la figure 22, on constate qu'effectivement, les plus grandes aires moléculaires sont obtenues pour des concentrations de cet ordre, soit $40 \text{ } \mu\text{g}$. Notons qu'à grande

concentration interfaciale initiale, les molécules de cyt *f* peuvent exercer les unes sur les autres une pression qui peut affecter l'efficacité de leur épandage et causer en partie leur désorption de la monocouche à la sous-phase. Un phénomène semblable est rapporté dans l'étude de la glycophorine à l'interface air-eau, une protéine membranaire de globule rouge (Davies *et al.*, 1983).

Les résultats abordés ci-dessus nous montrent que les différences observées dans les isothermes Π -A et ΔV -A sont reliées à la densité surfacique des molécules de cyt *f* initialement déposées. L'augmentation de la concentration interfaciale conduit à une nette solubilisation du cyt *f* dans la sous-phase. L'accroissement de l'aire moléculaire en fonction de la diminution de la concentration interfaciale montre qu'il y a une plus grande rétention du cyt *f* à la surface de la sous-phase (Tazi *et al.*, 1994).

4.1.2. Effet du solvant d'étalement sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*

Les isothermes Π -A et ΔV -A de cyt *f* obtenues pour différentes concentrations d'éthanol (solvant d'étalement) sont présentées dans la figure 23. La quantité de cyt *f* déposée à l'interface air-eau est de 40 μg (courbe 1 à 7). Les conditions expérimentales (la sous-phase, le temps d'attente et la vitesse de compression) employées dans cette étude sont similaires au cas précédent. L'erreur expérimentale déterminée dans ce cas est d'environ $\pm 1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour l'aire moléculaire, et de $\pm 5 \text{ mV}$

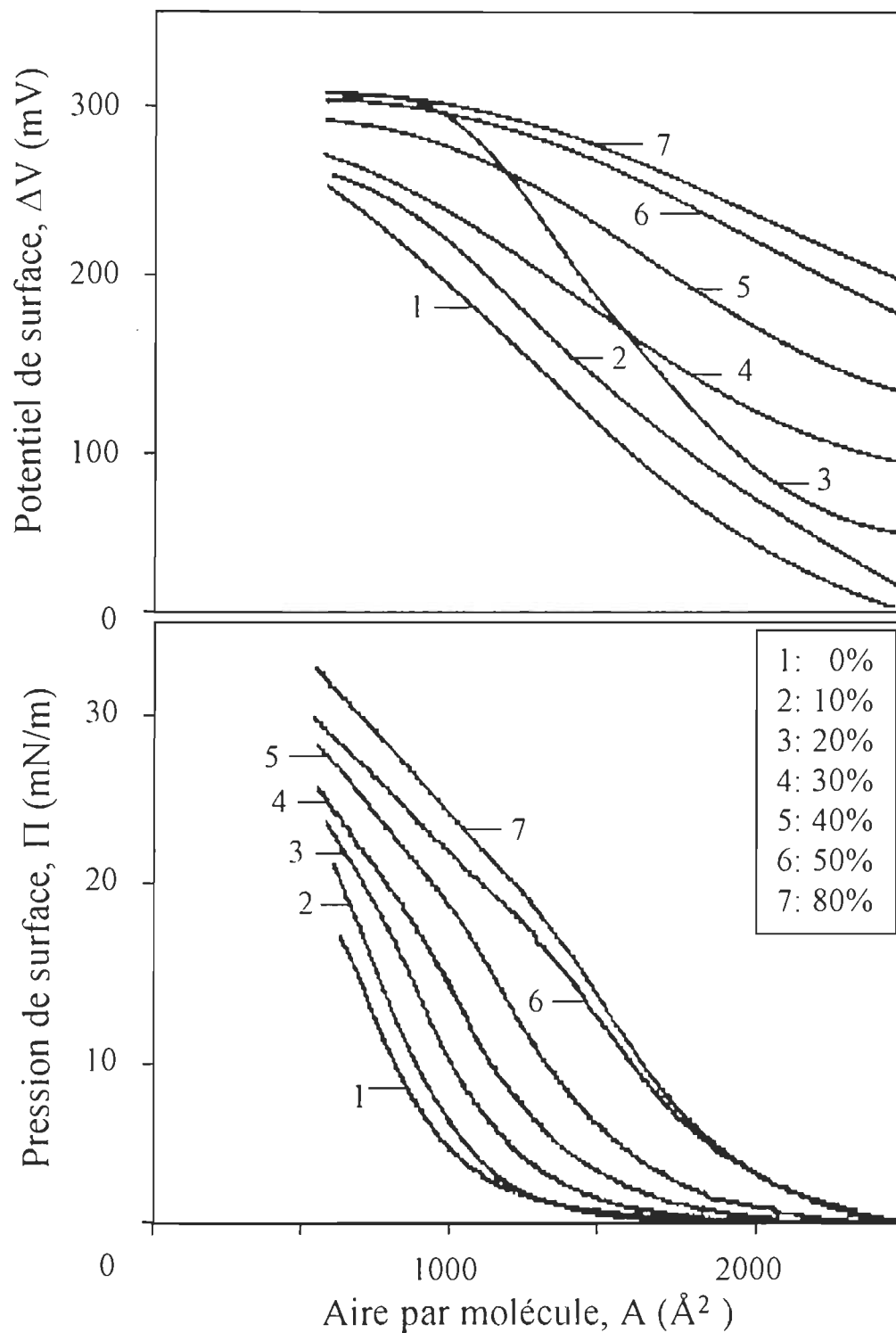


Figure 23. Effet du solvant d'étalement sur les isothermes Π - A et ΔV - A du cyt f . La protéine (40 μg) est déposée à la surface de la sous-phase à partir d'une solution constituée d'éthanol/eau. Les pourcentages d'éthanol utilisés pour la déposition du cyt f sont indiqués dans la figure. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

pour le potentiel de surface.

Ces résultats montrent qu'à faible concentration d'éthanol (Fig. 23, courbes 1 et 2), inférieure à 20%, il y a diminution de l'aire moléculaire et de la pression de surface. L'arrêt de la pression à 17 mN/m (courbe 1) et à 21 mN/m (courbe 2) ne présente pas de collapse bien défini. La faible pression déterminée dans ce cas est la preuve d'une nette solubilisation du cyt *f* dans la sous-phase. La courbe 3 de la figure 23 possède la forme courante rapportée pour de nombreuses protéines solubles (MacRitchie et Ter-Minassin-Saraga, 1984; Herrigton et Sahi, 1987). L'aire moléculaire extrapolée dans la portion linéaire de cette courbe à 0 mN/m est égale à 1300 Å²/molécule. Le changement de pente déterminant le collapse à 18 mN/m est mieux marqué.

Les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* (Fig. 23, courbe 3, 4, 5, 6 et 7) caractérisent bien des monocouches où la totalité des molécules est restée à l'interface air/eau au cours de la compression du film. Le changement de pente correspondant à la formation du collapse est bien défini. L'examen de ces résultats nous montre qu'il y a augmentation progressive et simultanée des isothermes Π -A vers les plus grandes aires moléculaires. Ce comportement nous porte à croire que les transformations manifestées par le cyt *f*, sous l'influence de la concentration d'éthanol, peuvent être attribuées au phénomène de dénaturation de la protéine. Cette dénaturation correspond aux modifications conformationnelles de la structure du cyt *f* répandue à l'interface

air-eau. Notons aussi qu'aucun changement spectrale n'a été observé sous l'influence de la concentration d'éthanol dans la solution protéinique (Gray, 1992). La forme spectrale est identique à celle montrée dans le chapitre I (paragraphe 1.3.4.2). Ce résultat nous montre que la protéine utilisée n'est pas dénaturée par le solvant d'étalement avant d'être déposée à la surface de la sous-phase.

L'effet dénaturant provoqué par la surface à la protéine, est probablement dû à une perte des structures secondaires et tertiaires du cyt *f*. Dans ces conditions, les résidus hydrophobes sont éjectés dans la phase aérienne alors que les résidus polaires demeurent dans la phase aqueuse de l'interface (MacRitchie, 1981). Cette situation résulte en une augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse en fonction de la concentration croissante d'éthanol, causée par la rétention de la protéine à la surface de la sous-phase (Tazi *et al.*, 1994).

4.1.3. Effet du pH de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*

L'effet du pH de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* est présenté dans la figure 24. Le pH de la sous-phase utilisé dans ce cas est de: 9.5, 9, 8, 7, 5 et 4. Les conditions expérimentales (le temps d'attente et la vitesse de compression) employées dans cette étude sont similaires au cas précédent.

L'examen de la figure 24 montre que la diminution graduelle du pH dans la sous-phase conduit à un changement visible dans les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. L'effet du pH décroissant, se manifeste par une augmentation appréciable de l'aire moléculaire limite et de la pression au collapse. Notons que l'aire moléculaire limite, obtenue à pH 9.5 (courbe 1) et pH 4.0 (courbe 6), passe de 850 Å² à 2130 Å². L'aire moléculaire déterminée à pH 4.0 et 5.0, proche du point isoélectrique: pH 4.7 (Gray, 1992), est maximale. ceci montre que la totalité des molécules est restée à la surface de l'eau. Le point isoélectrique tel que connu, correspond à une moyenne de charges neutres pour toute la surface de la protéine en contact ou submergée à la surface de l'eau.

Dans une étude antérieure, rapportée par Demel *et al.* (1991) sur l'effet du pH de la sous-phase de la toxine de diphtérie, l'augmentation de l'aire moléculaire limite et de la pression au collapse observée par ces auteurs est due à une transition de la protéine, d'une conformation globulaire compacte à une structure dénaturée moins compacte. Dans la présente étude, les transformations manifestées par le cyt *f* sous l'influence du pH de la sous-phase peuvent être liées au phénomène de dénaturation de la protéine dont les structures secondaires et tertiaires sont perturbées. L'augmentation de l'aire moléculaire et de la pression au collapse est un signe de l'apparition de changements conformationnels du cyt *f* à l'interface air/eau (Tazi *et al.*, 1994).

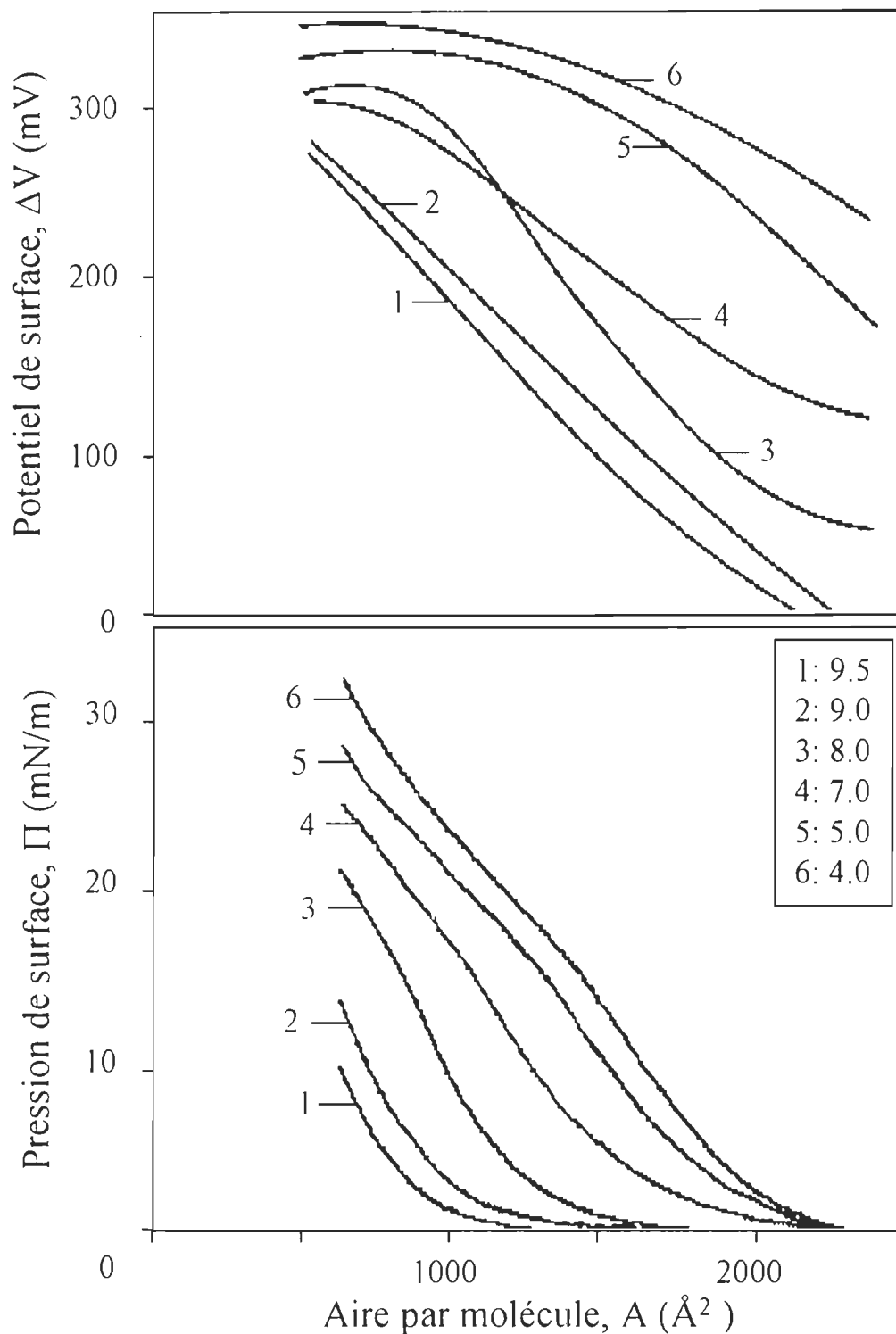


Figure 24. Effet du pH de la sous-phase sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les pH de la sous-phase utilisés dans ce cas sont indiqués dans la figure. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM.

La structure native et les dimensions qu'occupe cette protéine en solution ou dans une cellule biologique photosynthétique sont obscures. Les propriétés interfaciales du cyt *f* déterminées dans la présente étude ne peuvent être comparées à d'autres travaux antérieurs. En effet, la seule étude réalisée sur ce sujet, a été publiée par Chin et Brody (1975). Dans cette étude, les auteurs n'ont mentionné, ni la concentration interfaciale du cyt *f*, ni le solvant d'étalement utilisé. De plus, les conditions expérimentales utilisées par ces derniers (sous-phase très concentrée en phosphate de sodium et nature non indiquée du cyt *f*) diffèrent de celles utilisées dans notre travail. Pour ces raisons, une comparaison adéquate des isothermes Π -A et ΔV -A ne peut être portée à ce sujet.

4.1.4. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent de conclure que l'organisation du cyt *f* à l'interface air-eau dépend essentiellement de la nature de ses constituants et de son interaction avec son environnement.

Les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* sont hautement influencés par la concentration interfaciale. Cependant, il existe une concentration critique, de l'ordre de 0.5 mg/m², au-dessus de laquelle les molécules initialement déposées sont solubilisées dans la sous-phase.

Le solvant d'étalement, l'éthanol, a un effet considérable sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f*. Les fortes concentrations d'éthanol, supérieures à 20%, affectent largement la structure conformationnelle de la protéine, provoquant ainsi sa dénaturation à l'interface air-eau. La faible pression de surface déterminée à faible concentration d'éthanol montre une nette solubilisation du cyt *f* dans la sous-phase. L'augmentation progressive et simultanée des isothermes Π -A en fonction de la concentration d'éthanol, vers des grandes aires moléculaires, est la preuve d'une plus grande rétention du cyt *f* à l'interface air/eau.

Dans le cas du pH de la sous-phase, nous avons noté une augmentation appréciable de l'aire moléculaire limite et de la pression au collapse en fonction du pH décroissant. Il est probable que les transformations manifestées par le cyt *f*, sous l'influence du pH de la sous-phase, sont liées à un changement dans la conformation de la protéine à l'interface air/eau.

Afin de mieux cerner qualitativement les indices qui peuvent nous informer sur la structure conformationnelle du cyt *f*, il est d'intérêt d'étudier la structure topographique de cette protéine en film L-B par la technique de la SPM: la microscopie à effet tunnel et à force atomique. Ce genre d'étude constitue une suite logique au présent travail et permet d'identifier plus précisément les changements structuraux du cyt *f* à l'interface air/eau. Puisque cette technique est plus pertinente que d'autres, elle permet d'obtenir des informations précieuses sur la structure

topographique réelle du cyt f avec un haut degré de résolution pouvant atteindre l'échelle moléculaire.

4.2. Étude de la structure des films L-B du cyt f par AFM

Dans le paragraphe précédent, nous avons constaté que Le solvant d'étalement, l'éthanol, a un effet considérable sur les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt f . Les fortes concentrations d'éthanol, supérieures à 20%, affectent largement la structure conformationnelle de la protéine. Pour élucider ce comportement, nous avons décidé d'étudier par l'AFM et l'STM la topographie des film L-B de cyt f en fonction de la concentration d'éthanol et de la pression interfaciale (Π).

4.2.1. Effet de la pression interfaciale sur la structure des films L-B du cyt f préparés à 20% d'éthanol

4.2.1.1. Préparation d'une monocouche de cyt f déposée sur le mica

Nous avons examiné en premier lieu une monocouche de cyt f préparée à 20% d'éthanol. La monocouche est transférée sur le mica à 4 différentes pressions de surface, soit: 5, 10, 15 et 20 mN/m. Le transfert de la monocouche à 20 mN/m est effectué seulement pour le cas des films préparés à 80% d'éthanol. Les conditions expérimentales employées pour la préparation de la monocouche sont présentées dans le chapitre 4.1.1. Les pressions de transfert

sont choisies à partir de l'isotherme Π -A de la figure 22 (courbe 4). Le substrat utilisé pour le transfert de la monocouche de cyt f est placé verticalement au-dessus de la sous-phase. La vitesse de plongée et de montée du substrat est égale à 2 mm/min. Le temps de séchage de la monocouche transférée est de 30 min. Le transfert réalisé par cette méthode fournit une monocouche de type Z, ceci signifie que la déposition des molécules s'effectue lors de la montée du substrat de la sous-phase. Le rendement de la déposition (T) de la monocouche est estimé à 0.9 pour les films déposés à 15 mN/m, 0.8 pour 10 mN/m et 0.6 pour 5 mN/m. Suite au transfert de la monocouche, on passe à la visualisation du film.

4.2.1.2. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt f transférée à 5 mN/m sur le mica

La figure 25 montre une image AFM qui représente la structure de la surface du mica. Le film est balayé à l'air et en mode contact. Dans ce mode, l'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. La vitesse de balayage (S_r) utilisée pour la prise de image est égale à 8 Hz. La taille de l'image (S_z) est égale à 50 x 50 nm. La distance de séparation (Z_r) entre la pointe et l'échantillon est égale à 5 nm. Dans cette image, le mica possède une structure stable et plate sur de larges surfaces, ce qui fait de lui un substrat très utile pour IAFM.

La figure 26 montre les images AFM d'une monocouche de cyt f en film L-B transférée à 5 mN/m sur le mica. L'image 26.a

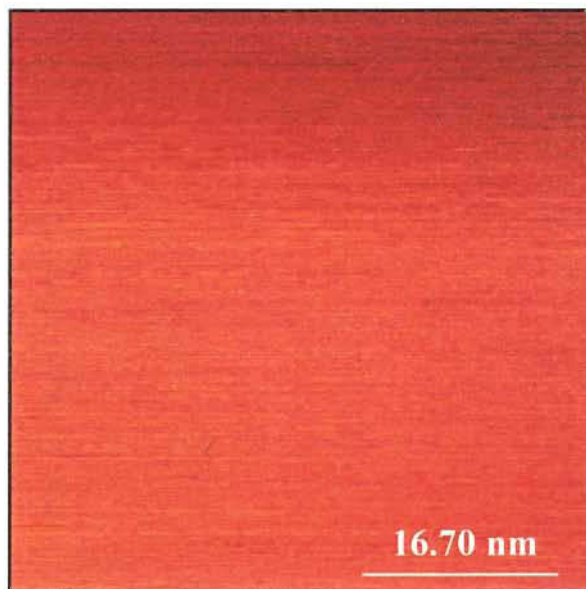


Figure 25. Image AFM de la surface du mica. La taille de l'image est égale à 50 x 50 nm (voir détails dans le texte).

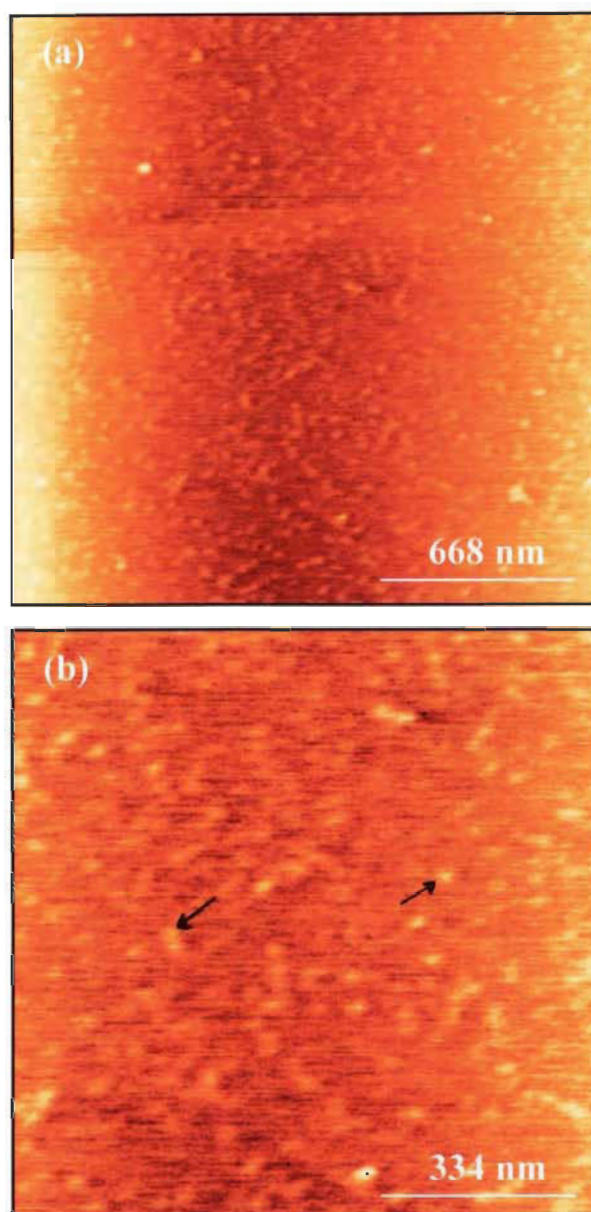


Figure 26. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 5 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μg) est de 20%. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 2 x 2 μm et 1 x 1 μm, respectivement (voir détails dans le texte).

($S_r=1.5$ Hz, $S_z=2$ μm , $Z_r=2$ nm) représente la structure surfacique du film L-B de cyt *f*. Cette surface est composée de grains de cyt *f* dispersés et bien étalés à la surface de mica. Les grains observés dans cette image possèdent approximativement la même forme et la même taille. L'image 26.b ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=1$ μm , $Z_r=2$ nm) présente une structure identique à l'image 26.a mais avec un agrandissement de 2 fois. Cette image montre bien l'emplacement des grains de cyt *f* sur le mica. Ces derniers sont distribués plus ou moins uniformément et ne possèdent aucune orientation spécifique sur le substrat. La taille moyenne de ces grains varie entre 35 et 60 nm. La comparaison entre la taille des grains déterminée à partir des images AFM et l'aire (1300 Å²) estimée à partir des isothermes Π -A (figure 22: courbe 4) suggère que le cyt *f* forme des agrégats à l'interface air-eau.

4.2.1.3. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt *f* transférée à 10 mN/m sur le mica

La figure 27 montre les images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 10 mN/m sur la surface du mica. L'image 27.a ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=3.5$ μm , $Z_r=3$ nm) montre aussi la formation d'agrégats de tailles égales à 45 nm. Le transfert de la monocouche à une pression de surface relativement plus élevée, soit 10 mN/m, donne au film L-B une structure plus dense. L'image 27.b ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=1.75$ μm , $Z_r=3$ nm) représente une vue agrandie 2 fois l'image 27.a. Comparée aux images 26.a et 26.b, l'image 27.b montre clairement, avec une meilleure résolution, la présence de défauts

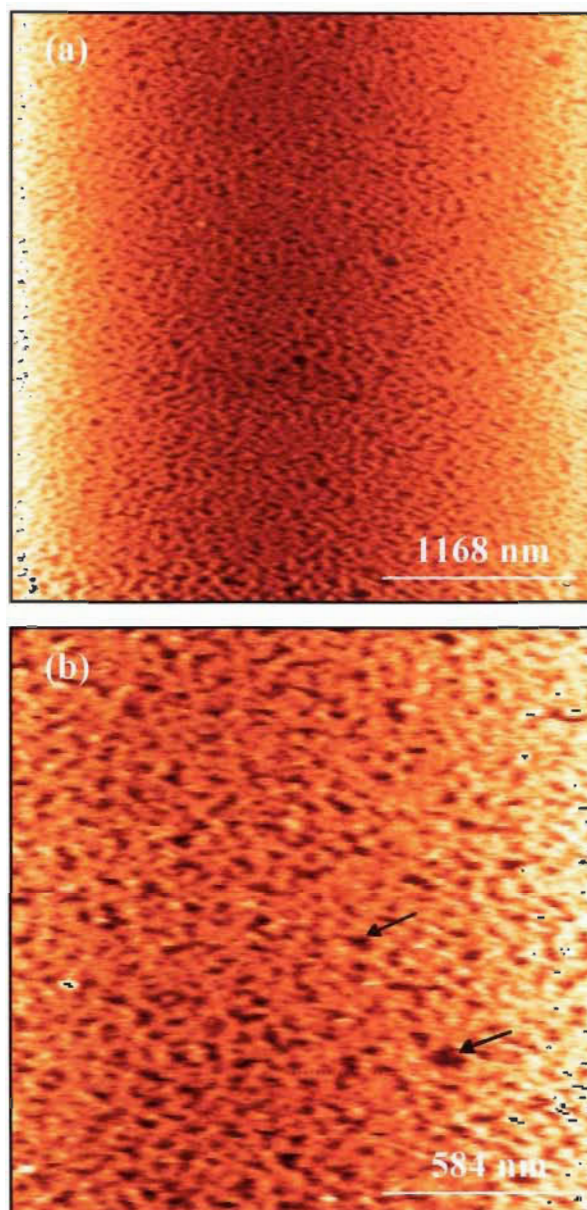


Figure 27. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 10 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 3.5 x 3.5 μ m et 1.75 x 1.75 μ m, respectivement (voir détails dans le texte).

dans la structure du film. Ces défauts apparaissent sous la forme de trous ayant un diamètre moyen de 100 nm. Il est probable que les trous créés à la surface du mica sont provoqués par le détachement de certaines molécules de cyt *f* lors du transfert à la jonction des trois phases, monocouche/sous-phase/substrat. Les molécules qui se détachent, retournent dans le film flottant à la surface. Notons aussi que la rétention d'eau entre les molécules de la monocouche de cyt *f* lors du transfert peut aussi créer des défauts intrinsèques dans la structure du film. La structure de la surface du film, déterminée dans cette étude, ne montre aucun ordre d'orientation à cette pression de transfert.

4.2.1.4. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt *f* transférée à 15 mN/m sur le mica

La figure 28 montre les images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 15 mN/m sur le mica. L'image 28.a ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=2.5$ μm , $Z_r=6$ nm) montre que le film L-B possède une structure plus compacte comparée aux films préparés à 5 et 10 mN/m. La surface du film est plate (non rugueuse) sur des grandes aires. L'image 28.b ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=1.25$ μm , $Z_r=6$ nm) représente une vue agrandie de 2 fois l'image 28.a. La différence de contraste, entre les images 28.a et 28.b montre clairement l'emplacement des grains au niveau de la surface de mica. Ces grains sont des agrégats de cyt *f*. Ces derniers possèdent approximativement la même taille (45 nm) que ceux formés aux pressions précédentes (5 mN/m et 10 mN/m). La grande densité des agrégats adsorbés sur

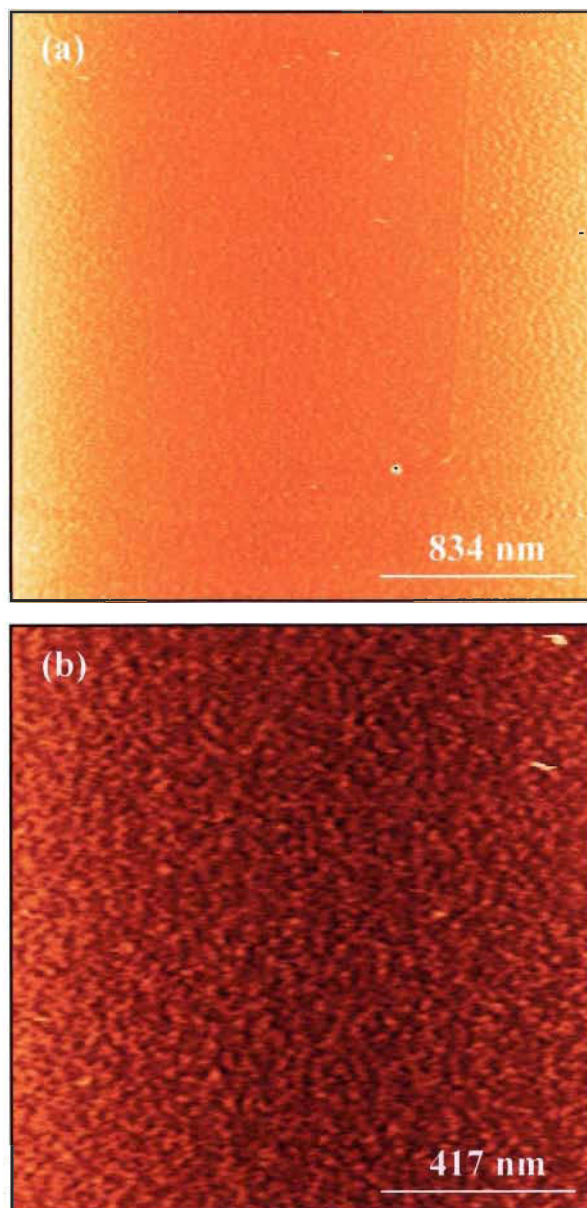


Figure 28. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 15 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 20%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 2.5 x 2.5 μ m et 1.25 x 1.25 μ m, respectivement (voir détails dans le texte).

la surface du mica indique que la monocouche de cyt *f*, transférée à une pression de surface plus élevée, possède une forte adhésion au substrat. Comme la surface du mica porte une charge négative, il est probable que la forme des agrégats observés soit due aux forces attractives exercées par la surface du mica sur la monocouche de cyt *f*. La faible différence de taille entre les agrégats formés aux trois différentes pressions suggère que l'agrégation de la protéine s'effectue à l'interface air/eau. De plus, l'effet de la pression interfaciale exercée sur les molécules de cyt *f* n'affecte pas la taille des agrégats observés (Tazi et al., 1996).

4.2.2. Effet de la pression interfaciale sur la structure des films L-B du cyt *f* préparés à 80% d'éthanol

4.2.2.1. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt *f* transférée à 5 mN/m sur le mica

La monocouche de cyt *f* examinée dans cette partie est préparée dans des conditions semblables à celles mentionnées dans la partie précédente. Les films L-B de cyt *f*, préparés à 80% d'éthanol (Fig. 23, courbe 7), sont déposés sur le mica à 4 différentes pressions de surface, soit: 5, 10, 15 et 20 mN/m. Le taux de transfert de la monocouche est estimé à 0.9 pour les films déposés à 20 mN/m, 0.7 pour 15 mN/m, 0.6 pour 10 mN/m et 0.4 pour 5 mN/m.

La figure 29 montre les images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 5 mN/m sur le mica. L'image 29.a

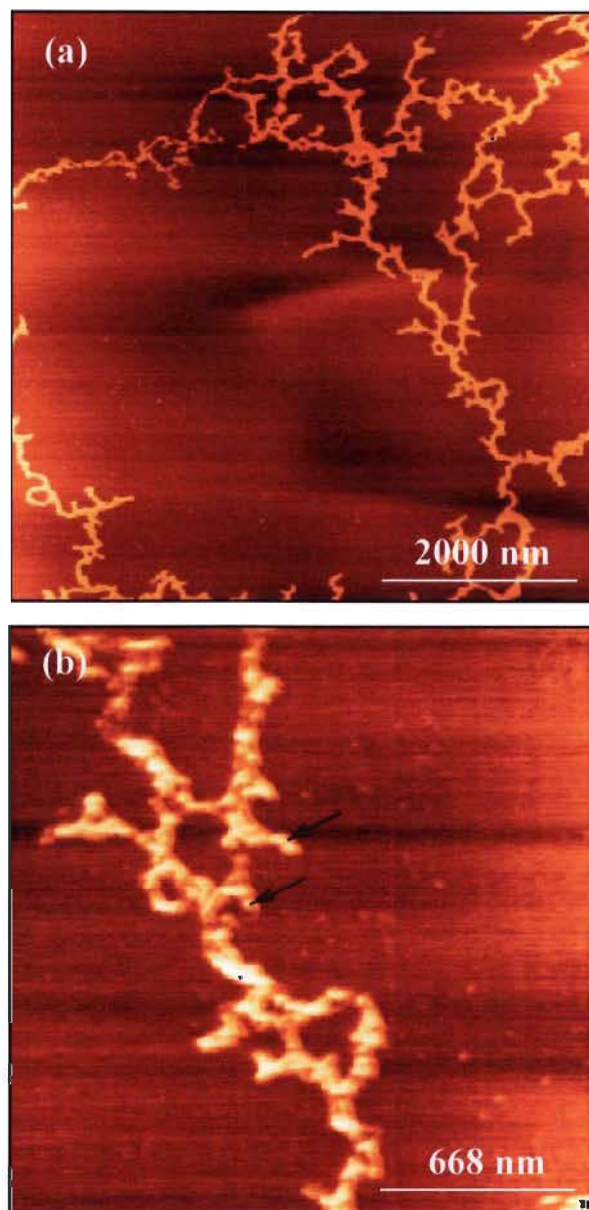


Figure 29. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 5 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 6 x 6 μ m et 2 x 2 μ m, respectivement (voir détails dans le texte).

($S_r=3.5$ Hz, $S_z=6$ μm , $Z_r=20$ nm) montre clairement la formation de domaines de cyt *f* à la surface du mica. L'image 29.b ($S_r=3.5$ Hz, $S_z=2$ μm , $Z_r=20$ nm) montre la même structure que l'image 29.a mais avec une vue 3 fois agrandie. En comparant ces images avec celles obtenues à 20% d'éthanol (figure 25), on peut facilement noter la différence remarquable observée dans la structure des films L-B du cyt *f* déposés à 5 mN/m. De plus, le taux de couverture de la surface de mica (figure 29) est nettement faible comparé à celui noté dans le cas de 20% d'éthanol (figure 25). Le plus frappant dans l'image 29.b est la forme des domaines de cyt *f* formés à la surface de mica. Ces domaines apparaissent en forme de chaînes faiblement compressées, larges et très bien connectées les unes aux autres. Soulignons aussi que ces domaines sont fins et ont une largeur moyenne égale à 100 ± 1 nm. L'examen de l'image 29.b montre aussi la présence de petits agrégats formés dans les domaines de cyt *f*. Comparés aux agrégats formés à 20% d'éthanol (images 25.b, 26.b et 27.b), les agrégats observés à 80% d'éthanol apparaissent avec la même forme et possèdent approximativement la même taille, soit de 50 ± 1 nm.

4.2.2.2. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt *f* transférée à 10 mN/m sur le mica

La figure 30 montre les images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 10 mN/m sur le mica. L'image 30.a ($S_r=2.5$ Hz, $S_z=4$ μm , $Z_r=15$ nm) montre la formation de domaines plus denses comparés à ceux visualisés à 5 mN/m (figure 29).

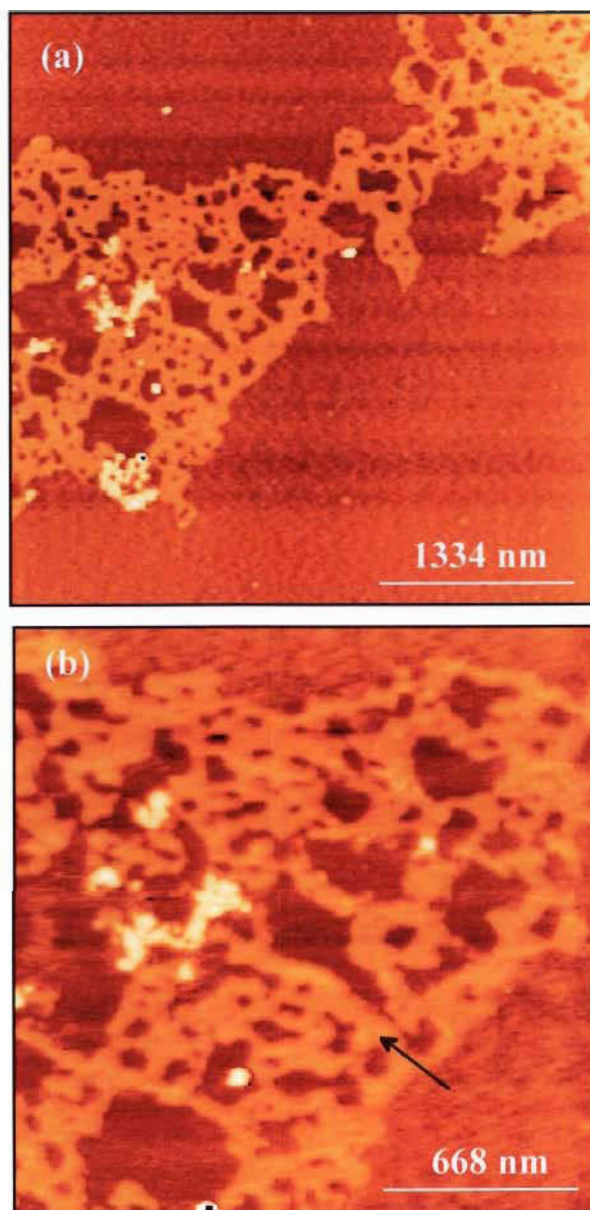


Figure 30. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 10 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μ m et 2 x 2 μ m, respectivement (voir détails dans le texte).

L'image 30.b ($S_r=2.5$ Hz, $S_z=2$ μm , $Z_r=15$ nm) présente la même structure que l'image 30.a mais avec une vue agrandie 2 fois. Les domaines, observés dans ce cas, gardent leur forme et tendent à couvrir une surface plus large. Les branches de ces derniers sont bien connectées les unes aux autres. La taille moyenne des domaines peut atteindre 2 ± 1 μm , alors que la largeur des branches varie entre 100 et 150 ± 1 nm. Il est clair que l'augmentation de la taille des domaines notés dans cette étude est due au regroupement des branches provoqué par l'augmentation de la pression de surface exercée sur les molécules de cyt *f*.

4.2.2.3. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt *f* transférée à 15 mN/m sur le mica

La figure 31 présente des images AFM qui montrent la structure du film L-B déposé à 15 mN/m. Contrairement aux cas précédents, le transfert de la monocouche de cyt *f* à 15 mN/m donne aux domaines une structure plus dense. L'image 31.a ($S_r=3.5$ Hz, $S_z=4$ μm , $Z_r=20$ nm) montre que les domaines formés dans ce cas sont plus larges que ceux visualisés à 5 et 10 mN/m. Ces derniers possèdent une taille qui varie entre 250 et 700 ± 1 nm. L'image 31.b ($S_r=3.5$ Hz, $S_z=2$ μm , $Z_r=20$ nm) montre le même contenu que l'image 31.a mais avec une vue agrandie 2 fois. Dans cette image, les agrégats de cyt *f* possèdent une taille moyenne de l'ordre de 60 ± 1 nm. Il est important de souligner que, durant le balayage de la surface du film, nous avons constaté que certaines parties du substrat ne sont pas bien couvertes. Comme nous l'avons déjà

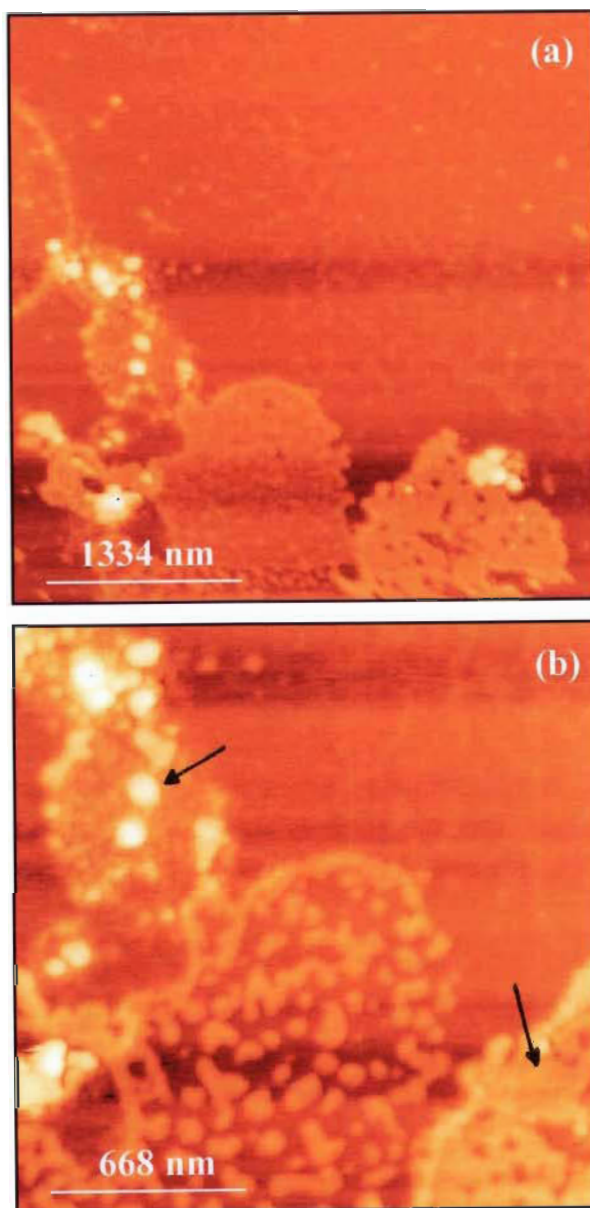


Figure 31. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 15 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μg) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm et 2 x 2 μm, respectivement (voir détails dans le texte).

signalé au paragraphe 4.2.1.3, il est possible que la faible couverture de la surface soit due à la présence de défauts dans la structure du film, détachement de certaines molécules de cyt *f* du film lors du transfert. Il est également possible que les films préparés à 80% d'éthanol et déposés à 15 mN/m soient faiblement compressés par rapport aux films préparés à 20% d'éthanol. L'épandage de la protéine à grande concentration d'éthanol affecte largement la structure des films. En effet, cette augmentation de la concentration d'éthanol diminue la dissociation des groupes chargés des molécules protéiques. Dans ces conditions, il est possible que la structure désordonnée observée dans les films soit due à la dénaturation du cyt *f*.

4.2.2.4. Visualisation par AFM d'une monocouche de cyt *f* transférée à 20 mN/m sur le mica

Les observations rapportées dans le paragraphe précédent nous portent à examiner la structure des films préparés dans les mêmes conditions, mais transférés à une pression plus élevée, soit de 20 mN/m. La figure 32 montre les images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 20 mN/m sur le mica. L'image 32.a ($S_r=3.5$ Hz, $S_z=2$ μ m, $Z_r=10$ nm) montre la structure surfacique du film L-B de cyt *f*. L'image 32.b ($S_r=3.5$ Hz, $S_z=1$ μ m, $Z_r=10$ nm) présente une vue rapprochée de la structure du film transféré à la même pression. La différence entre ces images et celles des films déposés à 15 mN/m (Figure 31) est frappante. L'examen des images 32.a et 32.b montre clairement que la structure du film est très

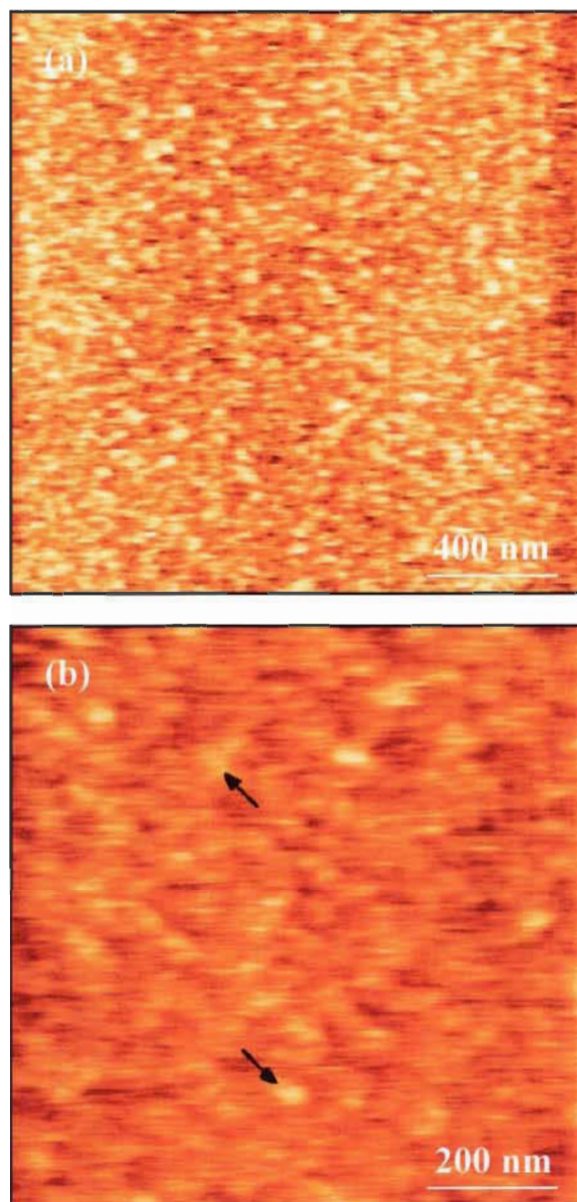


Figure 32. Images AFM d'une monocouche de cyt *f* en film L-B transférée à 20 mN/m sur le mica. La concentration d'éthanol utilisée pour la déposition du cyt *f* (40 μ g) est de 80%. Les films sont balayés à l'air et en mode contact. L'intensité de la force est maintenue constante entre 1 et 5 nN. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 2 x 2 μ m et 1 x 1 μ m, respectivement (voir détails dans le texte).

compacte comparée à celle des images 31.a et 31.b. De plus, cette structure est semblable à celle des films préparés à 20% d'éthanol et déposés à 15 mN/m (figure 28). La forme et la taille (45 nm) des agrégats déterminées dans ce cas sont identiques à celles observées dans les films préparés à 20% d'éthanol. L'augmentation de la pression interfaciale exercée sur le film permet aux molécules de cyt *f* de se regrouper entre elles, formant ainsi des agrégats de même taille. Considérant ces résultats, il est clair que l'augmentation de la concentration d'éthanol dans la solution protéique affecte largement la structure conformationnelle du cyt *f*. La structure topographique des films L-B de cyt *f* déterminée dans la présente étude, en fonction de la concentration d'éthanol et de la pression interfaciale exercée sur les molécules de cyt *f*, est une preuve directe des changements observés dans les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* étalé à l'interface air/eau (Tazi *et al.*, 1997).

4.2.3. Effet du substrat sur la structure des films L-B de cyt *f*

Dans le but d'étudier l'effet du substrat sur la structure des films L-B du cyt *f*, nous avons effectué sur l'Au(111) un prédépot de trois couches d'acide arachidique (C₂₀). Cette méthode de modification de la surface de l'Au(111) permet d'améliorer le taux de transfert de la protéine sur le substrat modifié. De plus, la déposition du C₂₀ sur l'Au(111), modifie la nature de la surface du substrat. En effet, cette modification rend hydrophobe la surface hydrophile de l'Au(111).

4.2.3.1. Isotherme Π -A de l'acide arachidique (C_{20})

L'acide arachidique (C_{20}) est déposé à la surface de l'eau pure à partir d'une solution de chloroforme, préparée à une concentration de 0.3 mg/ml. Après évaporation du solvant, le film monomoléculaire est comprimé lentement à une vitesse de 3 mm/min. L'isotherme Π -A de compression (figure 33) montre la relation entre la pression superficielle (Π) et l'aire moléculaire (A) occupée par les molécules de C_{20} étalées à l'interface air/eau. La pression varie de 0 à 57 mN/m, valeur au-delà de laquelle est observé un effondrement du film suite à la formation du collapse. La caractéristique la plus importante de cette courbe est l'existence d'une transition de phase à une pression de surface égale à 26 mN/m. À partir de cette pression, les molécules de C_{20} occupent la même aire moléculaire à l'interface air/eau. L'aire moléculaire extrapolée dans la portion linéaire de la courbe à 0 mN/m est égale à 19 mN/m. Ces résultats sont en bon accord avec ceux déterminés par Brousseau *et al.* (1993), Pezron *et al.* (1990).

4.2.3.2. Le substrat modifié

Dans ce paragraphe, nous décrivons les différentes phases de fabrication du film L-B de C_{20} déposé sur l'Au(111), que nous appelons substrat modifié: Au(111)/ C_{20} .

Au cours du transfert du film monomoléculaire de C_{20} étalé à la surface de l'eau, la pression superficielle exercée sur les molécules

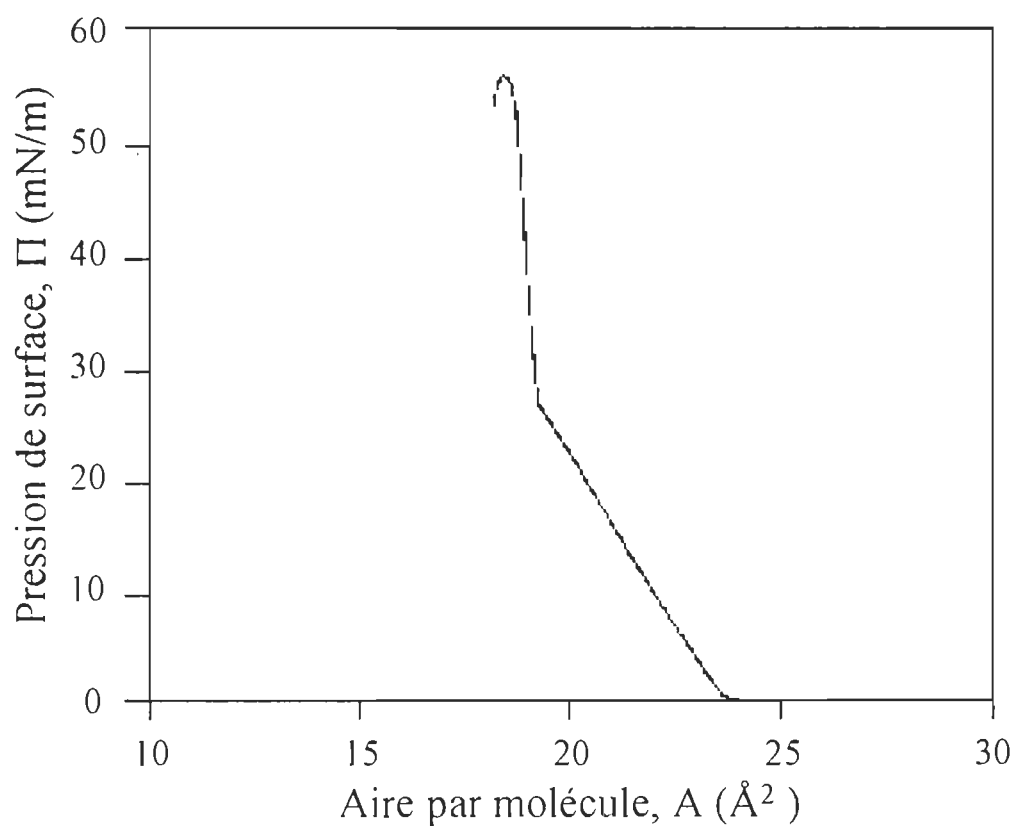


Figure 33. Isotherme Π - A de l'acide arachidique (C_{20}). La monocouche de C_{20} est préparée à partir d'une solution de chloroforme (0.3 mg/ml). Sous-phase: eau pure, pH: 5.6.

est maintenue constante à 30 mN/m par asservissement de la position de la barrière mobile. L'Au(111) est utilisé, comme substrat hydrophile, pour le transfert du C₂₀. L'échantillon est placé verticalement au-dessus de la surface de l'eau. La vitesse de plongée et de montée du substrat est égale à 2 mm/min. Le temps de séchage des films transférés est de 30 min. Rappelons que la méthode de préparation des films d'Au(111) est présentée dans le chapitre 2 (paragraphe 2.3). En effet, le transfert de la première couche de C₂₀ sur l'Au(111) s'effectue lors de la montée du substrat de la sous-phase. Les molécules amphiphiles de C₂₀ adhèrent au substrat hydrophile par l'intermédiaire de leurs têtes polaires hydrophiles. Lorsque l'échantillon est retiré du bain, il traverse une seconde fois le film. Cependant, les molécules se trouvant sur l'eau se transfèrent grâce aux interactions de leurs chaînes aliphatiques fortement hydrophobes avec les chaînes aliphatiques de la première couche (interactions de van der Waals). Lors de la montée de l'échantillon de la sous-phase, les têtes hydrophiles de la deuxième couche transférée interagissent avec les molécules se trouvant sur l'eau. Ainsi, une troisième couche est transférée (type Y), celle-ci rend la surface du substrat modifié [Au(111)/C₂₀] hydrophobique.

4.2.3.3. Visualisation par STM du substrat modifié [Au(111)/C₂₀]

L'image 34.a ($S_r=2$ Hz, $S_z=6$ μ m, $Z_r=25$ nm) montre la topographie de la surface d'Au(111) déposé sur le mica. Le balayage de la surface du film est effectué à l'air et en mode courant constant

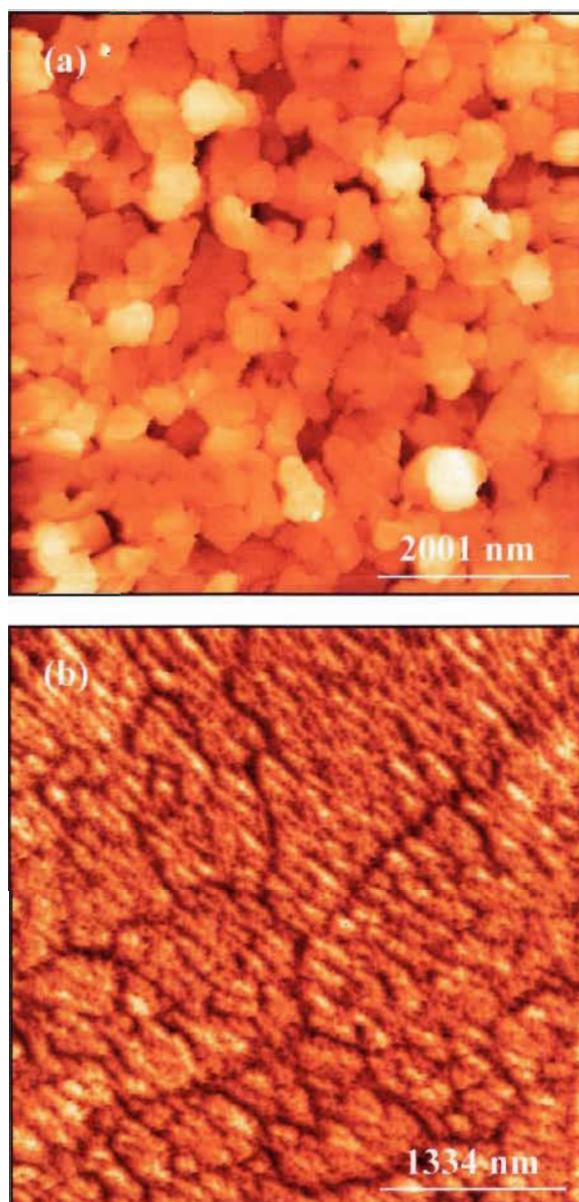


Figure 34. (a): Image STM de la surface d'Au(111) déposé sur le mica. (b): Image STM de 3 monocouches de C₂₀ déposées à 30 mN/m sur l'Au(111). Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 6 x 6 μm et 4 x 4 μm , respectivement (voir détails dans le texte).

($I_t = 0.45$ nA). La tension électrique (V_b) appliquée entre la pointe tunnel et l'échantillon est égale à -90 mV. Dans cette image, la structure polycristalline de l'Au(111) forme des îles empilées les unes sur les autres. La dimension moyenne de ces îles varie entre 250 et 500 ± 1 nm. La topographie de la surface d'Au(111) déterminée dans cette étude est en bon accord avec celle rapportée par DeRose *et al.* (1991), Salmeron *et al.* (1992). L'image 34.b ($S_r=2$ Hz, $S_z=4$ μ m, $Z_r=25$ nm) représente la topographie du film L-B de C_{20} visualisé par STM ($I_t=0.1$ nA, $V_b=-30$ mV). Le film est formé de 3 monocouches de C_{20} déposées à 30 mN/m sur l'Au(111). Dans cette image, on constate que le C_{20} forme des domaines compacts. La dimension moyenne de ces derniers varie entre 0.6 et 1 μ m. Notons aussi que la surface du film d'Au(111) modifiée est nettement moins rugueuse que celle du film non modifié. Il est clair que la topographie des films de C_{20} est affectée par la rugosité du substrat. Les films de C_{20} sont en effet très stables à l'interface air/eau. Une fois transférés sur des substrats rugueux, ces films créent des ponts entre les aspérités de surface, et quelques couches suffisent à rendre le substrat presque plat à l'échelle moléculaire. En effet, les films L-B de C_{20} forment une bonne surface de support. Ces résultats se comparent bien avec ceux réalisés par d'autres chercheurs sur la modification de substrats rugueux (Birdi et Vu, 1994; Schwartz *et al.*, 1992; Hui *et al.*, 1995).

4.2.3.4. Visualisation par STM du cyt f déposé sur l'Au(111)/C₂₀

La déposition du cyt f sur l'Au(111) est pratiquement impossible à cause de la rugosité de ce substrat. Cette difficulté nous oblige à couvrir la surface des films d'Au(111) avec 3 monocouches de C₂₀. Cette modification de la surface d'Au(111) permet une très bonne déposition de la protéine. La figure 35 ($I_t=0.1$ nA, $V_b=-90$ mV) représente les images STM du film L-B d'une bicouche de cyt f préparée à 20% d'éthanol (Fig. 23, courbe 3). La bicouche (type Y) est transférée à une pression de surface égale à 15 mN/m. L'image 35.a ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=6$ μ m, $Z_r=35$ nm) montre la structure de la surface du film L-B de cyt f déposé sur l'Au(111)/C₂₀. Les points hauts (blancs) observés sur cette image correspondent aux régions de plus grandes densités, tandis que les points bas (noirs) correspondent aux trous formés lors du transfert. L'influence de la nature du substrat sur la qualité des films obtenus après transfert est déterminante. En effet, les agrégats de cyt f observés par STM sur l'Au(111)/C₂₀ adoptent une forme différente de celle visualisée par AFM sur le mica à 15 mN/m (figures 28 et 31). Cette différence de forme est probablement due à la différence qui existe entre les deux substrats. L'image 35.b ($S_r=1.5$ Hz, $S_z=3$ μ m, $Z_r=35$ nm) montre une vue plus rapprochée de la surface du film. Cette image montre bien le regroupement des agrégats de cyt f formés sur l'Au(111)/C₂₀. Ces derniers sont distribués uniformément et ne possèdent aucune orientation spécifique. La dimension moyenne de ces agrégats varie entre 200 et 400 ± 1 nm. Comparés aux agrégats

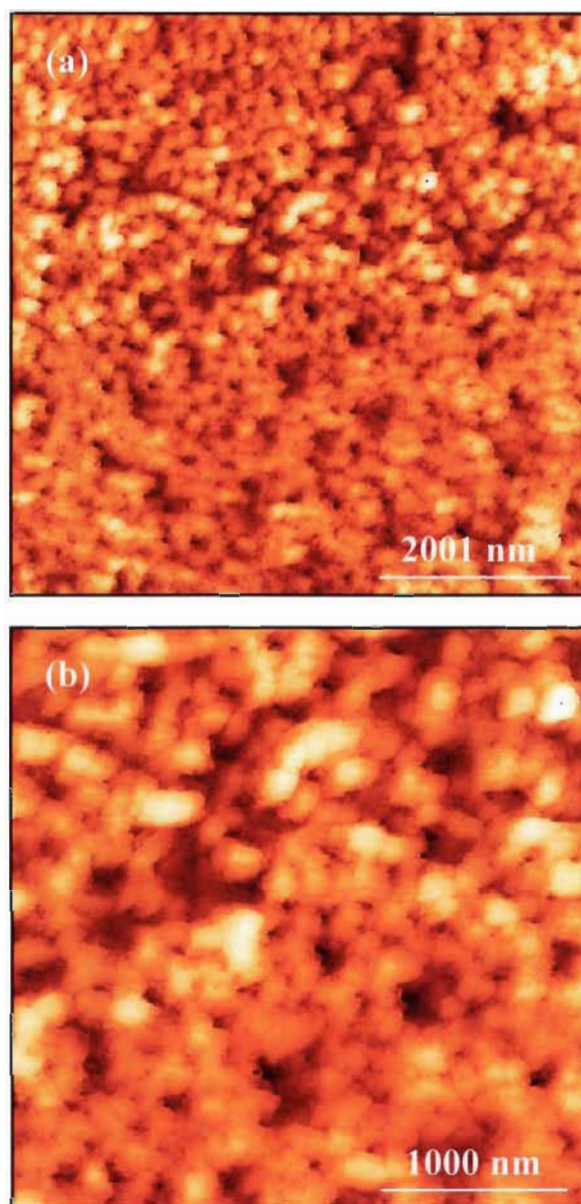


Figure 35. Images STM d'une bicouche de *cyt f* en film L-B préparée à 20% d'éthanol. La bicouche est transférée sur l' $\text{Au}(111)/\text{C}_{20}$ à une pression de surface égale à 15 mN/m. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à $6 \times 6 \mu\text{m}$ et $3 \times 3 \mu\text{m}$, respectivement (voir détails dans le texte).

observés sur le mica, ceux déterminés dans la présente étude sont largement plus grands. La différence qui existe entre les images STM et AFM est probablement due à l'effet de l'épaisseur du film ainsi que la forme et les dimensions de la pointe tunnel (Markiewicz et Goh, 1995; Keller et Franke, 1993). En effet, lorsque la pointe tunnel approche les régions épaisses, le courant tunnel diminue dramatiquement. Cette diminution peut causer un mouvement inhabituel de la pointe lors du balayage de la surface du film. Ce travail est sous-pressé dans le journal *Langmuir* (Tazi *et al.*, 1997).

4.2.4. Conclusion

La structure topographique des films L-B de cyt *f* déterminée dans la présente étude, en fonction de la concentration d'éthanol et de la pression interfaciale exercée sur les molécules de cyt *f*, est une preuve directe des changements observés dans les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* étalé à l'interface air/eau.

Dans le cas des films préparés à 20% d'éthanol, les images AFM du cyt *f* déposé sur le mica montrent une faible différence de taille entre les agrégats formés à 5, 10 et 15 mN/m. Ceci suggère que l'agrégation de la protéine s'effectue à l'interface air/eau. De plus, l'effet de la pression interfaciale exercée sur les molécules de cyt *f* n'affecte pas la forme des agrégats observés. La présence de défauts dans la structure des films est probablement provoquée par le détachement de certaines molécules de cyt *f* lors du transfert. Notons aussi que la rétention d'eau entre les molécules de la

monocouche de cyt *f* lors du transfert peut aussi créer des défauts dans la structure du film.

Un des éléments clé de l'agrégation du cyt *f* est le solvant d'étalement, l'éthanol, dans la solution protéique. L'agrégation du cyt *f* à 20% d'éthanol est différente de celle formée à 80%. L'effet de la concentration d'éthanol sur la structure des films devient apparent à 80% d'éthanol. En effet, la taille des agrégats formés à 20% d'éthanol est de l'ordre de 50 nm. Cependant, à 80% d'éthanol, les agrégats observés forment des domaines ayant une largeur de l'ordre de 100 nm. Les domaines formés dans la structure des films préparés à 80% d'éthanol, déposés à 5 et 10 et 15 mN/m sur le mica, sont une indication de faible interaction entre les agrégats de cyt *f*. Par contre ceux déposés à 20 mN/m, montrent une très grande densité d'empilement des agrégats de cyt *f*. Ceci est dû aux grandes forces de cohésion, entre les agrégats de cyt *f*, provoqués par l'effet de la pression de surface.

Dans le cas des films L-B de cyt *f* visualisés par STM, nous avons étudié l'effet du substrat sur la structure d'une bicouche de cyt *f* préparée à 20% d'éthanol. Rappelons que le transfert de la bicouche est effectué à une pression de surface égale à 15 mN/m. Toutefois, l'utilisation de l'Au(111) nous oblige à couvrir la surface des films d'Au(111) avec 3 monocouches de C₂₀ déposées à 30 mN/m. La modification de l'Au(111) permet une très bonne déposition de la protéine. La taille des agrégats formés sur l'Au(111)/C₂₀ est différente de celle observée sur le mica. La

dimension moyenne de ces agrégats varie entre 200 et 400 ± 1 nm. Comparés aux agrégats visualisés par AFM, ceux observés par STM sont largement plus grands. La différence qui existe entre les images STM et AFM est probablement due à l'effet du substrat utilisé, de l'épaisseur du film ainsi qu'à la forme et les dimensions de la pointe tunnel.

4.3. Étude de la structure des films L-B du cyt *f* incorporé dans une monocouche lipidique

Dans cette section, nous nous proposons d'étudier l'influence de deux lipides membranaires, le MGDG et le DGDG sur la conformation et l'organisation du cyt *f*. Ces deux lipides sont neutres et représentent 75% des lipides rencontrés dans la membrane photosynthétique (Nishihara *et al.*, 1980; Hooper, 1984). Le choix de ces deux lipides pour cette étude peut être justifié par le fait qu'ils constituent la matrice dans laquelle baignent les protéines membranaires. Il jouent un rôle important dans les aspects structurel et fonctionnel de la membrane photosynthétique (Hooper, 1984; Webb et Green, 1991). Afin de comprendre le mécanisme de base des interactions qui existent dans les complexes lipide/protéine, une intéressante approche est de les reconstituer dans un système modèle bien défini, soit celui des films L-B. La reconstitution membranaire doit tenir compte du fait que "*in vivo*" la membrane biologique contient très peu de protéines. En effet, les protéines interagissent avec les lipides en faible fraction molaire, soit de l'ordre de quelques unités pour cent. En

considérant un poids moléculaire moyen de 20 000 pour les protéines, et de 850 pour les lipides, la fraction molaire doit être de l'ordre de 4 à 5 molécules de protéine pour 100 molécules de lipide.

L'utilisation de la microscopie SPM pour la visualisation des complexes reconstitués dans le système modèle des films L-B permet d'obtenir d'une part, des informations précieuses sur la structure topographique réelle de ces systèmes, et d'autre part, l'organisation et l'état physique de l'agrégation de la protéine.

4.3.1. Structure des films L-B du mélange MGDG/cyt f

4.3.1.1. Propriétés interfaciales du MGDG et du mélange MGDG/cyt f

L'étalement d'une protéine à l'interface s'effectue de sorte que les segments polaires restent plongés dans l'eau, alors que les segments apolaires sont dirigés vers la phase aérienne. Cette situation offre l'avantage de pouvoir incorporer la protéine, grâce aux segments hydrophobes, dans une monocouche lipidique. Comme le cyt f et les lipides concernés ne sont pas solubles dans les mêmes solvants, l'épandage respectif des deux constituants sera réalisé comme décrit dans le chapitre 3 (paragraphe 4.3.1.1).

Les courbes de pression de surface (Π) en fonction de l'aire moléculaire (A) du MGDG et du mélange MGDG/cyt f sont

représentées dans la figure 36. Chaque courbe est une moyenne établie à partir de quatre expériences réalisées dans les mêmes conditions expérimentales. L'écart maximum enregistré entre les moyennes est de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour le MGDG et de $4 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour le mélange MGDG/cyt *f*. Dans le cas du MGDG, la pression de surface débute à partir d'une aire moléculaire égale à $150 \pm 1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Le collapse est situé à une pression de surface égale à $41.0 \pm 0.5 \text{ mN/m}$ et une aire moléculaire égale à $74 \pm 0.5 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Ce dernier correspond à une saturation de pression et marque le passage de la monocouche à une phase tridimensionnelle. Les études antérieures réalisées par Almog *et al.* (1988) ont montré que la monocouche de MGDG possède une grande instabilité à l'interface air/eau. Dans notre cas, l'isotherme Π -A du MGDG pur, reproduit dans des conditions similaires à celles de ces chercheurs, ne montre aucun signe d'instabilité. De plus, après avoir comprimé la monocouche de MGDG jusqu'au collapse, celle-ci est restée stable pendant 6 heures. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de Bishop *et al.* (1980), Tancrede *et al.* (1982).

Dans le cas du mélange MGDG/cyt *f*, la protéine est incorporée à la monocouche lipidique par épandage d'une solution préparée à 20% d'éthanol, la fraction molaire de cyt *f* est de 5%. La monocouche ainsi formée est grandement influencée par la présence de la protéine. L'isotherme Π -A présentée dans la figure 36 montre l'existence de deux collapses situés à 16.0 et à $39.0 \pm 0.5 \text{ mN/m}$. Cette situation montre qu'il y a une séparation de phase. Chaque constituant est éjectée de la monocouche vers la phase aérienne, au

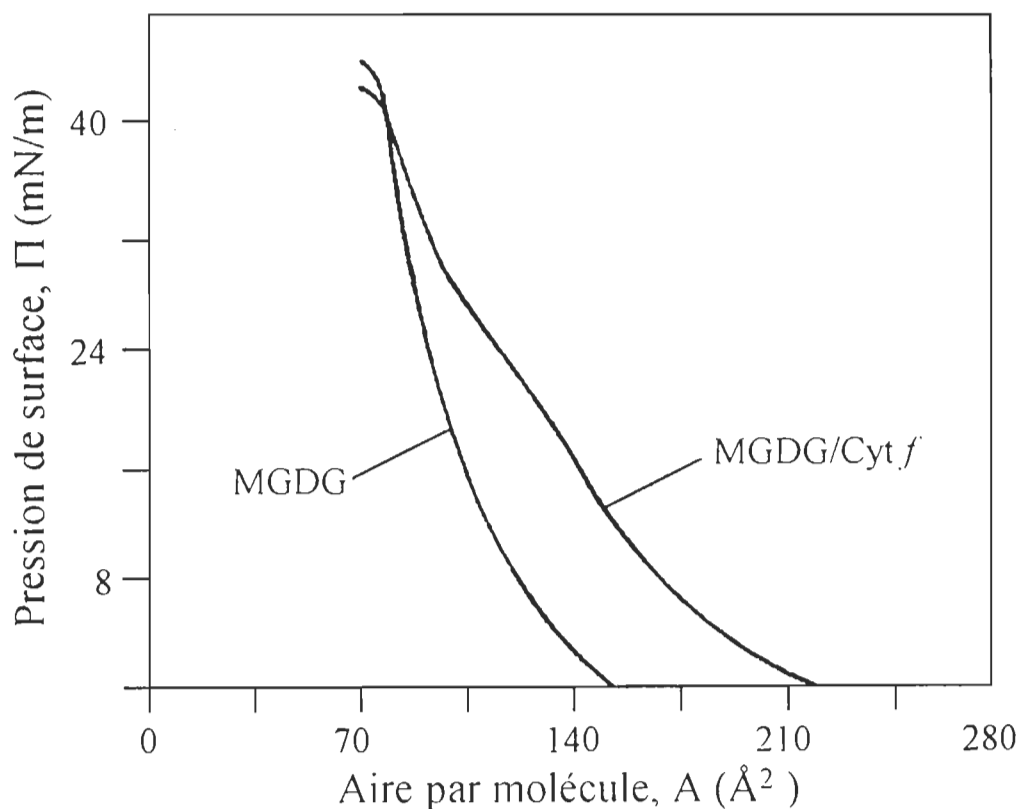


Figure 36. Isotherme Π - A du MGDG et du mélange MGDG/cyt *f*. La monocouche de MGDG est préparée à partir d'une solution constituée de chloroforme:méthanol (9:1, v:v) à une concentration de 0.25 mg/ml. Le cyt *f* est incorporé à la monocouche lipidique par épandage d'une solution préparée à 20% d'éthanol, la fraction molaire de cyt *f* est de 5%. La vitesse de compression est de 4 \AA^2 molécule⁻¹ s⁻¹. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

delà de la pression correspondante à son collapse. Le transfert de la monocouche mixte est effectué à 26 mN/m sur le mica, le mica modifié (mica couvert par une monocouche de C_{20}) et l'Au(111) (Gaines, 1966., Fidelio *et al.*, 1987).

4.3.1.2. Visualisation par STM du mélange MGDG/cyt f en film L-B

La figure 37 présente deux images STM qui montrent la structure du film L-B du mélange MGDG/cyt f déposé sur l'Au(111). Le balayage de la surface du film est effectué à l'air et en mode courant constant ($I_t = 0.1$ nA). La tension électrique (V_b) appliquée entre la pointe tunnel et l'échantillon est égale à -100 mV. L'image 37.a ($S_r=2$ Hz, $S_z=4$ μ m, $Z_r=25$ nm) montre la topographie de la surface du film sur une large échelle. Cette image présente la surface de l'Au(111) couverte par des petits domaines triangulaires. Ces derniers sont distribués uniformément au-dessus de la surface de l'Au(111). Il est important de souligner que la distance Z ($Z_r=25$ nm) de cette image est du même ordre de grandeur que celle utilisée pour le balayage de la surface d'Au(111). Cette constatation confirme la distribution uniforme des domaines triangulaires sur la surface de l'Au(111). L'image 37.b ($S_r=2$ Hz, $S_z=1$ μ m, $Z_r=25$ nm) montre la même structure que l'image 37.a mais avec une vue agrandie 4 fois. Cette image montre clairement que les petits domaines sont très bien orientés à la surface de l'Au(111). Ils ont une longueur moyenne de 120 ± 1 nm et une largeur de 65 ± 1 nm.

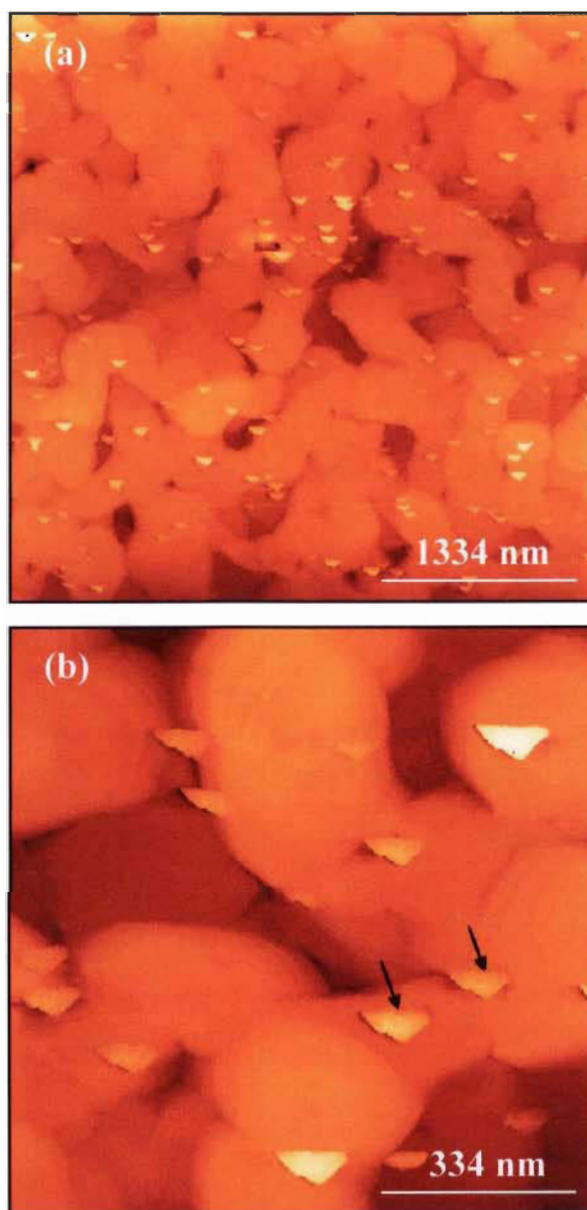


Figure 37. Images STM de la structure du film L-B du mélange MGDG/cyt *f* déposé sur l'Au(111). Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm et 1 x 1 μm , respectivement (voir détails dans le texte).

La figure 38 ($I_t=0.1$ nA, $V_b=-100$ mV) représente la morphologie d'un seul domaine formé dans le mélange MGDG/cyt *f*. L'une des remarques frappantes notées durant le balayage de la surface du film est la formation de paire de cône d'orientation similaire. L'image 38.a ($S_r=2$ Hz, $S_z=165$ nm, $Z_r=14$ nm) montre que chaque domaine triangulaire est formé de deux agrégats de cyt *f*. Ces agrégats apparaissent en forme de cônes solides. Ils ont une longueur de l'ordre de 65 ± 1 nm et une largeur de 35 ± 1 nm. Ces derniers possèdent des petites queues de longueur égale à 20 nm. L'image 38.b ($S_r=2$ Hz, $S_z=66$ μ m, $Z_r=14$ nm) montre, avec une meilleure résolution, une vue rapprochée des cônes. Dans cette image il est facile de reconnaître les particules individuelles de cyt *f* sur les parties supérieures des cônes. Ces dernières apparaissent comme des bosses au-dessus de la surface du domaine triangulaire.

La figure 39 présente le profil des particules de cyt *f*. La ligne discontinue tracée dans l'image 38.b correspond au tracé de la courbe du profil. Cette courbe montre que les particules de cyt *f* possèdent une hauteur égale à 0.2 nm et un diamètre égal à 5 nm. L'aire moléculaire moyenne déterminée à partir de ces mesures est égale à 19.6 nm². Notons aussi que la différence de hauteur observée, entre les points les plus bas et les plus hauts, est probablement due à la rugosité de la surface de l'Au(111).

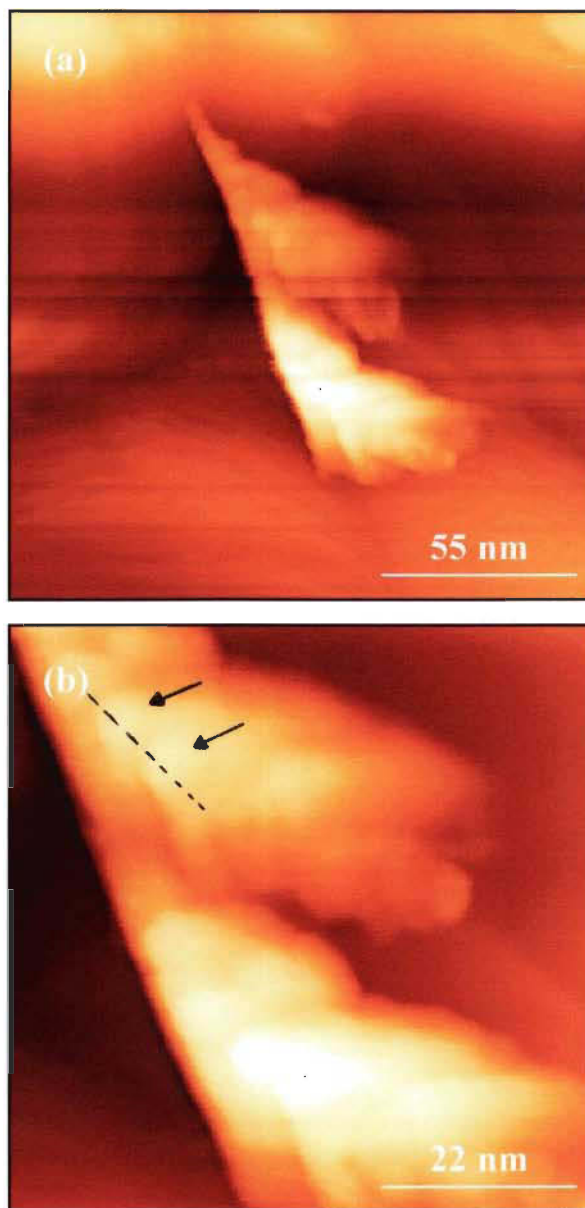


Figure 38. (a): Image STM de la morphologie d'un seul domaine triangulaire formé dans le mélange MGDG/cyt f déposé sur l'Au(111). (b): Une vue rapprochée, par AFM, de la paire de cônes. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 165 x 165 nm et 66 x 66 nm, respectivement (voir détails dans le texte).

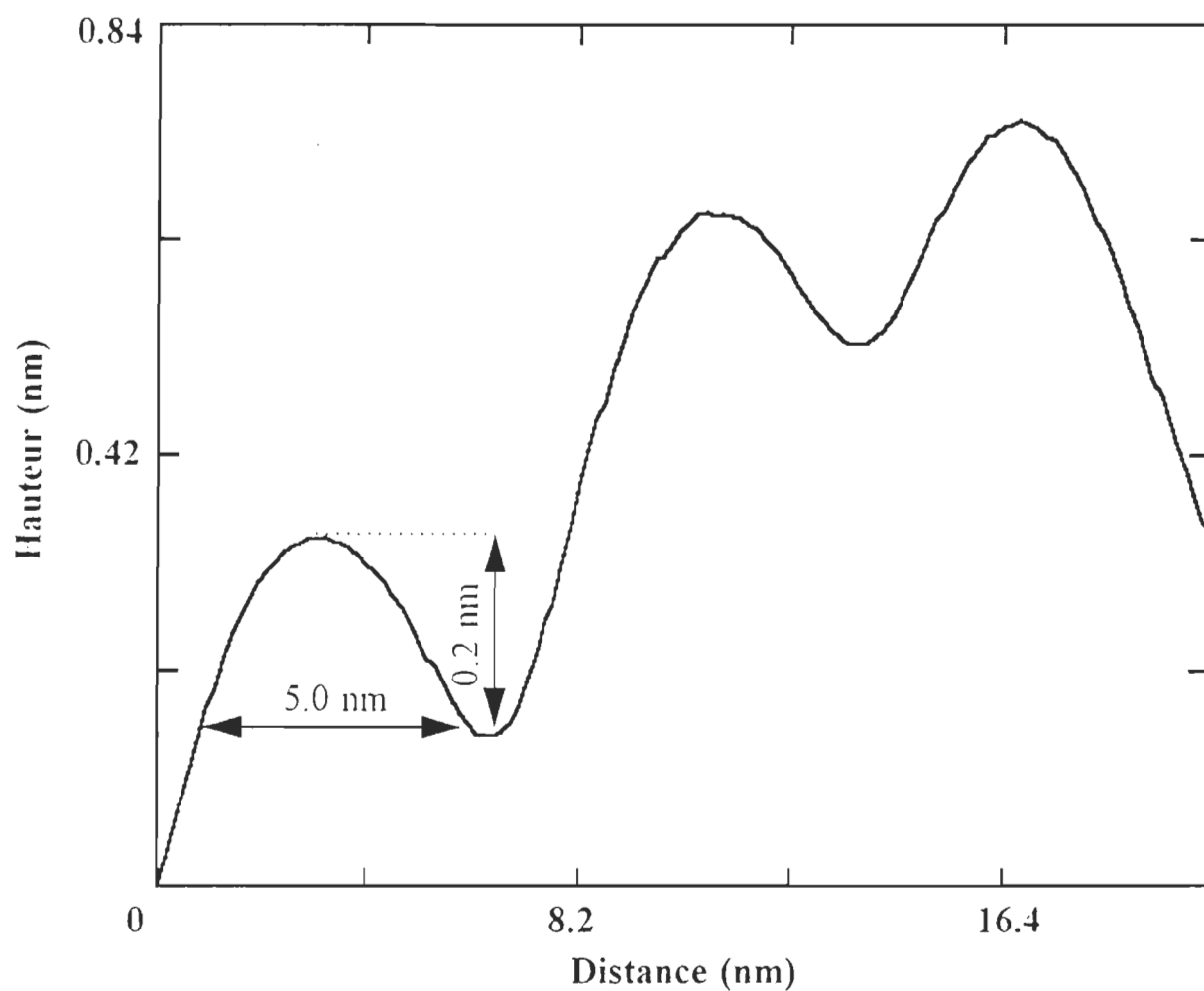


Figure 39. Courbe de profil des particules de cyt *f*. La ligne discontinue tracée dans l'image 38.b correspond au tracé de ce profil.

La figure 40 présente une vue en 3 dimensions des cônes observés dans l'image 38.b. Cette image montre que les particules de cyt *f* apparaissent avec une forme globulaire au dessus des cônes. La différence de contraste, entre les images 38.b et 40 montre clairement l'emplacement des particules au niveau de la surface de l'Au(111). De plus, la rotation des cônes de 105° par rapport à l'axe des Z et de 75° autour de l'axe des X permet de déterminer l'orientation des cônes par rapport à la surface de l'Au(111). Ces derniers sont orientés de 75° par rapport au plan de la surface. Il est probable que cette orientation soit causée par la présence du champ électrique orienté suivant la direction normale à la surface de l'Au(111). Considérant la taille des agrégats et celle des particules globulaires, il est clair que les cônes sont des agrégats de cyt *f* composés d'un certain nombre de particules de cyt *f*. Toutefois, l'absence de MGDG autour des agrégats de cyt *f* est visible au niveau des images STM. Il est possible que les molécules de ce lipide soient déplacées par le mouvement de la pointe lors du balayage de la surface du film.

4.3.1.3. Visualisation par AFM du mélange MGDG/cyt *f* en film L-B

Dans ce paragraphe, nous examinons à l'aide de l'AFM la structure des mêmes films visualisés par l'STM. Cette étude permet de vérifier la topographie des films L-B du mélange MGDG/cyt *f* déterminée précédemment. L'image 41.a ($S_r=10$ Hz, $S_z=4$ μm , $Z_r=25$ nm) montre la topographie de la surface du film sur

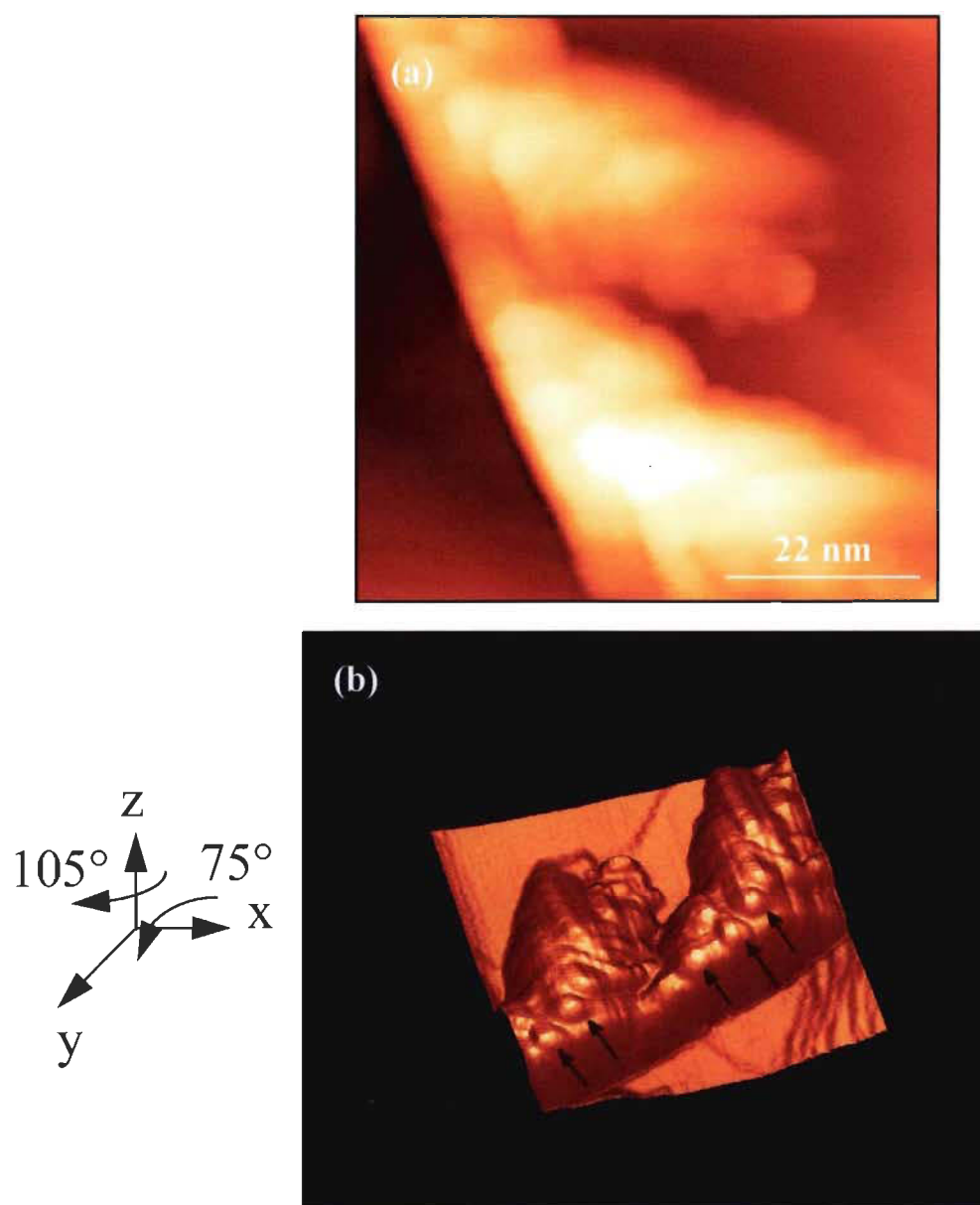


Figure 40. Vue en 3 dimensions de la paire des agrégats de cyt *f* observée dans l'image (b) de la figure 38, présentée en haut.

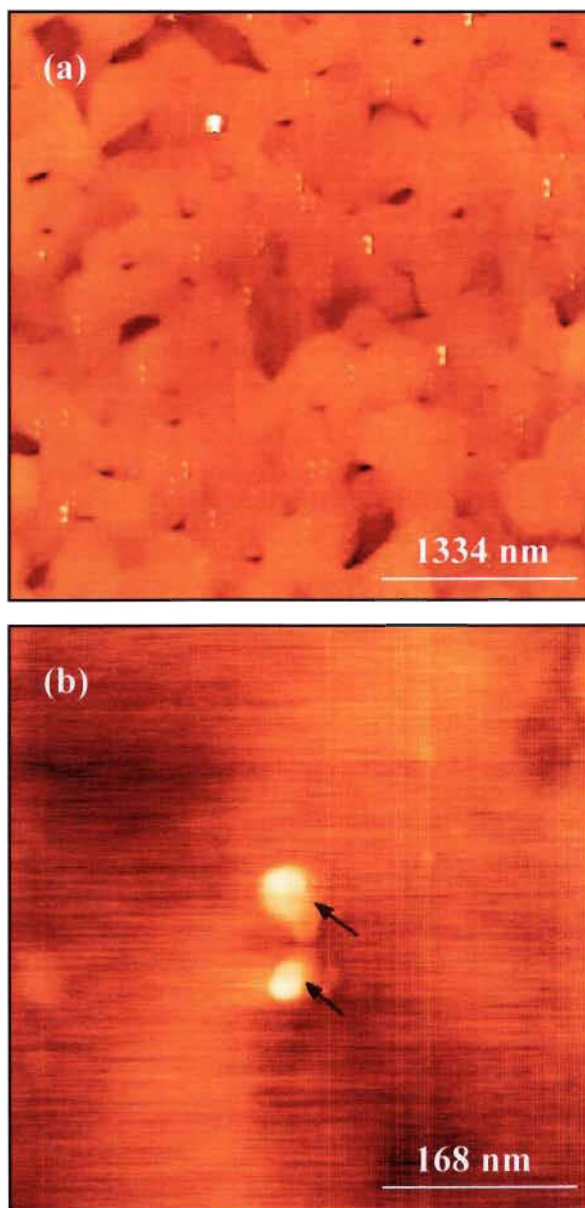


Figure 41. (a): Image AFM de la topographie de la surface du film L-B du mélange MGDG/cyt *f* déposé sur l'Au(111). (b): Une vue rapprochée, par AFM, de la paire de cônes. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à 4 x 4 μm et 0.5 x 0.5 μm , respectivement (voir détails dans le texte).

une large échelle. Cette image présente la surface de l'Au(111) couverte par des petits domaines. Ces derniers sont distribués uniformément au-dessus de la surface de l'Au(111). Cette image montre clairement que les petits domaines possèdent des formes coniques. Ces formes sont reproductibles sur l'ensemble de la surface du film MGDG/cyt *f* et très bien orientées à la surface de l'Au(111). L'image 41.b ($S_r=8.5$ Hz, $S_z=0.5$ μm , $Z_r=20$ nm) montre, avec une meilleure résolution, une vue rapprochée d'une paire de cônes. Les images AFM, déterminées dans la présente étude, confirment la présence de paires d'agrégats observées par STM. En effet, contrairement aux petits domaines triangulaires observés par STM (figure 37), les images AFM montrent la présence de paires de cônes de cyt *f* avec une orientation différente de celle déterminée par STM. Les cônes sont solides et ont une longueur de l'ordre de 60 ± 1 nm et une largeur de l'ordre de 45 ± 1 nm. Il est probable que les formes d'agrégats, déterminées par STM et AFM, soient provoquées par les forces de cohésion entre les particules de cyt *f*. Notons aussi que la forme et la qualité de la pointe peuvent affecter la structure du film. L'absence de lipide dans les images STM et AFM est probablement due à une faible adhésion du film lipidique aux substrats. De plus, il est fort possible que les agrégats de cyt *f* interagissent faiblement avec les molécules lipidiques. L'intensité de ces interactions est probablement plus faible que celle des interactions entre les agrégats de cyt *f*, ce qui rend la visualisation du film lipidique pratiquement impossible à l'échelle moléculaire (Tazi *et al.*, 1996).

4.3.1.4. Topographie du mélange MGDG/cyt f en film L-B déposé sur le mica modifié (mica/C₂₀)

Dans le but d'élucider le motif d'absence du lipide autour des agrégats de cyt f déterminés précédemment, nous avons transféré une bicouche de mélange MGDG/cyt f sur le mica couvert par une monocouche de C₂₀. Le transfert de C₂₀ et de la bicouche lipidique est effectué à 30 et 26 mN/m, respectivement.

Dans le paragraphe 4.2.3.3, le STM nous a permis d'observer la structure de la surface d'un film L-B de 3 monocouche de C₂₀ transféré à 30 mN/m sur l'Au(111). Ce même film est également transféré sur le mica afin d'être examiné à l'aide de l'AFM. La figure 42 ($S_r=8$ Hz, $S_z=50$ μ m, $Z_r=12$ nm) présente une image AFM de la surface d'une monocouche de C₂₀ déposée sur le mica. Dans cette étude, on constate que le film L-B de C₂₀ possède une très bonne organisation et un grand empilement des particules à la surface du mica. La structure de la surface du film de C₂₀ visualisée par AFM est complètement différente de celle observée par STM. L'image 43 montre la structure du film avec une meilleure résolution comparée à celle du STM. Il est clair que la structure du film de C₂₀ déposé sur l'Au(111) déterminée par STM (figure 34.b) est affectée par la rugosité du substrat, l'Au(111).

La figure 43 ($S_r=2$ Hz, $S_z=4$ μ m, $Z_r=70$ nm) présente une image AFM de la topographie du mélange MGDG/cyt f en film L-B déposé sur le mica modifié (mica/C₂₀). Cette image présente la structure

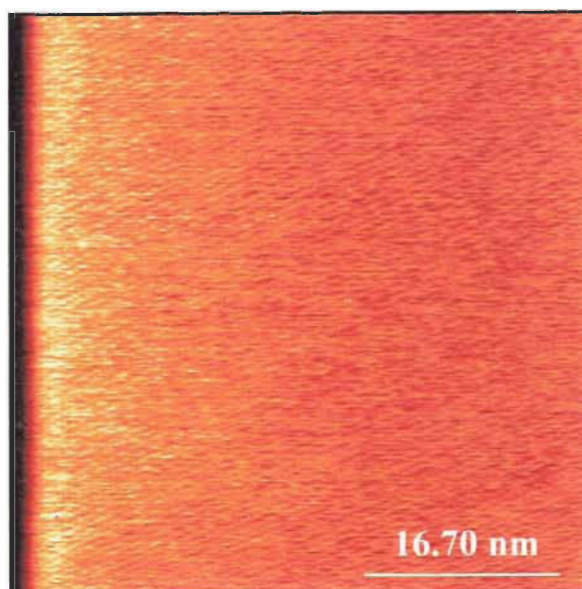


Figure 42. Image AFM de la structure surfacique d'une monocouche de C₂₀ déposé sur le mica. La taille de l'image est égale à 50 x 50 nm (voir détails dans le texte).

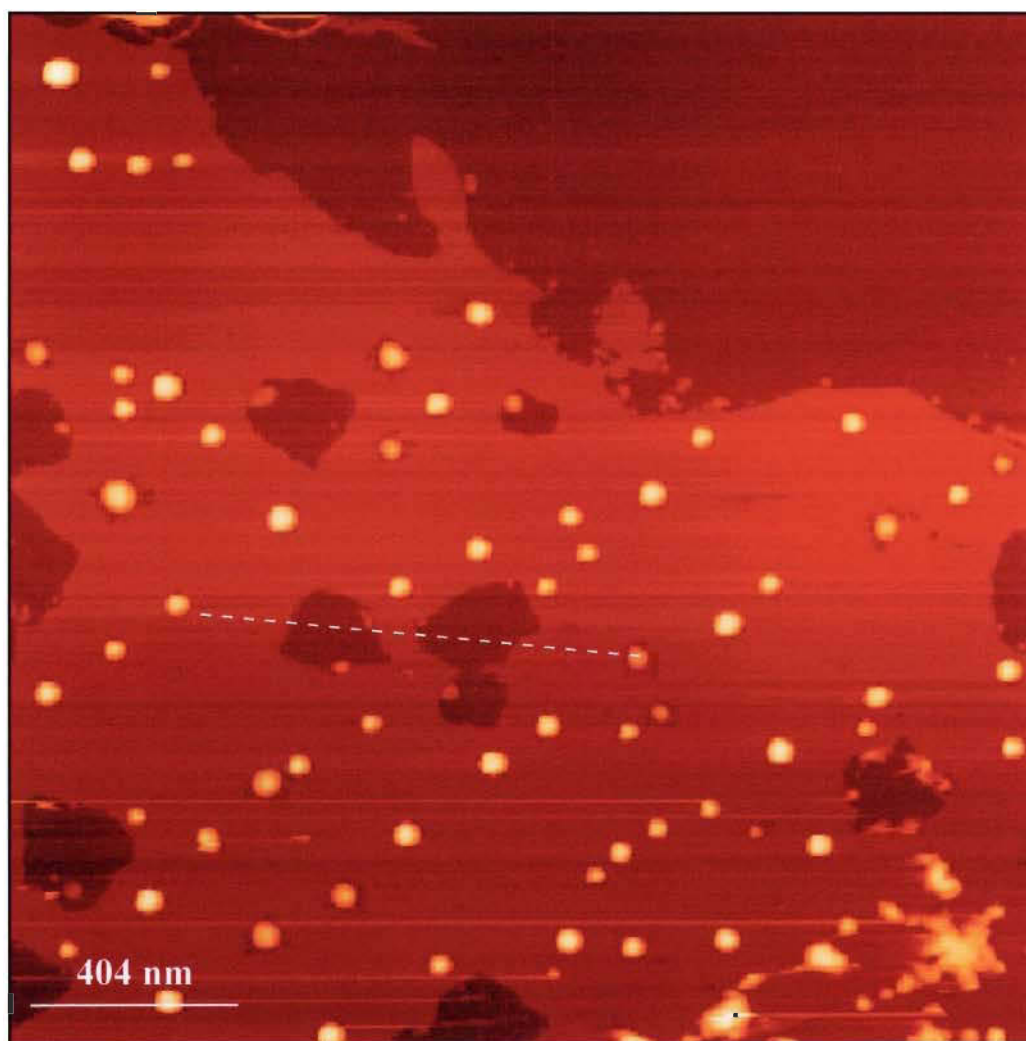


Figure 43. Image AFM de la topographie du mélange MGDG/cyt f en film L-B déposé sur le mica modifié (mica/C₂₀). La taille de l' image est de 4 x 4 μm (voir détails dans le texte).

surfacique d'une monocouche de C₂₀ couverte par la bicouche lipidique de MGDG/cyt *f*. Contrairement aux paires d'agrégats formées sur l'Au(111), les agrégats observés sur le mica modifié possèdent une forme circulaire. Ces derniers sont distribués uniformément au-dessus de la surface de C₂₀. Notons aussi qu'il y a formation de domaines dans la structure du film lipidique.

La figure 44 présente la courbe de profil de l'agrégat de cyt *f* et du domaine formé dans la bicouche lipidique. Cette courbe correspond à la ligne discontinue tracée dans l'image 43. La largeur et l'épaisseur des domaines déterminées à partir du profil sont de l'ordre de 428 ± 5 et de 4.2 ± 0.1 nm respectivement. Il faut noter que la valeur de cette épaisseur correspond bien au double de la taille d'une molécule de lipide (Marra, 1985). La présence du grand pic dans la figure 44 correspond à la hauteur de l'agrégat formé dans le mélange. Les domaines et les agrégats formés dans la structure du film peuvent être la conséquence d'une faible interaction entre les molécules des deux constituants aussi bien que d'un dépliement résultant du changement conformationnel du cyt *f*. Cette faible interaction est beaucoup plus faible que celle existant entre les molécules de corps purs. Les molécules de chaque constituant ont alors tendance à s'associer entre elles pour former des domaines et des agrégats. Ce phénomène d'association peut être assimilé à une séparation de phase entre les deux constituants. Ces résultats expliquent bien la formation de deux collapses dans l'isotherme Π -A du mélange MGDG/cyt *f* (section 4.3.1.1). La topographie des films L-B du MGDG/cyt *f* déterminée

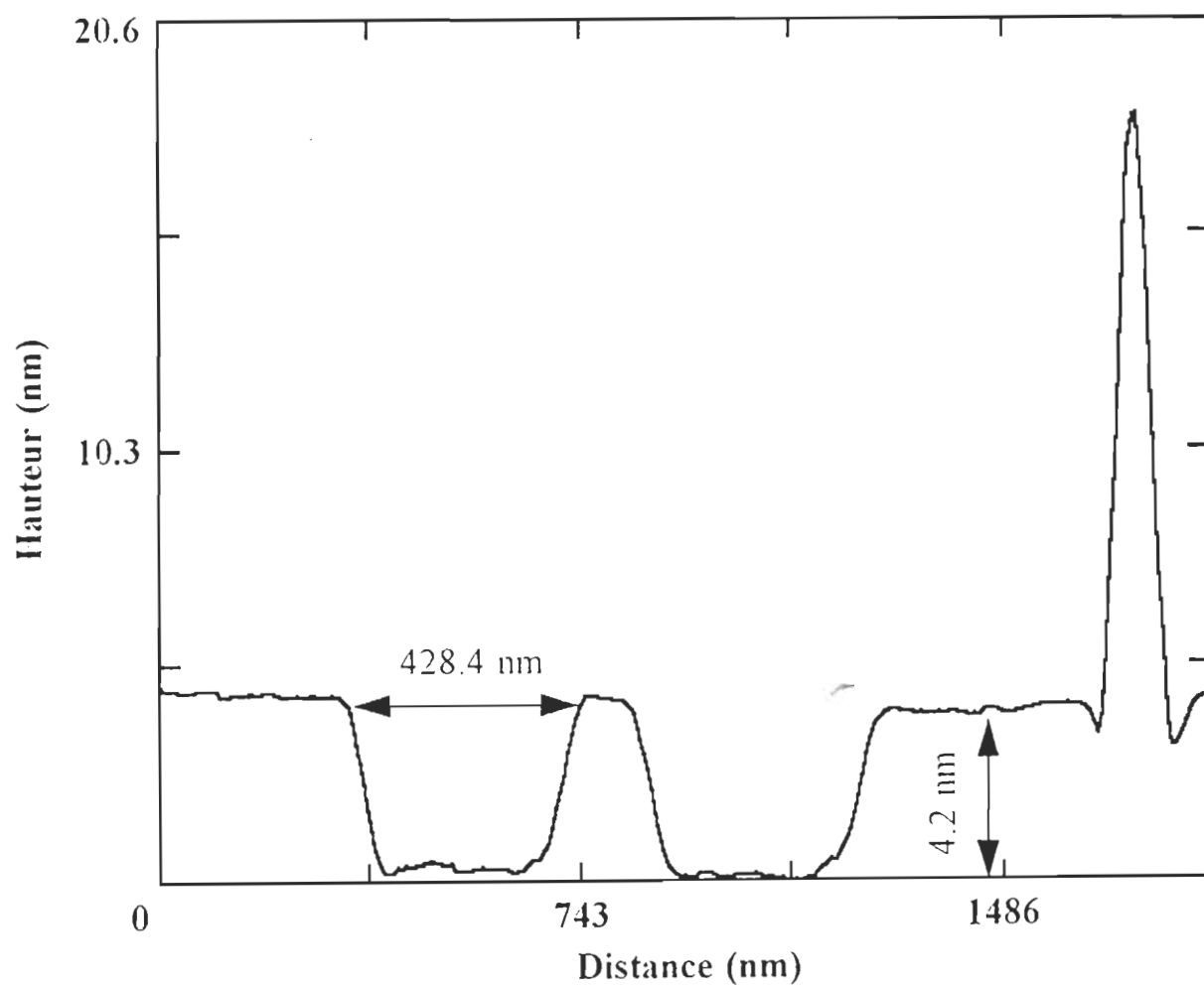


Figure 44. Courbe du profil de l'agrégat de cyt *f* et du domaine formé dans la bicouche lipidique. La ligne discontinue tracée dans l'image 43 correspond au tracé de ce profil.

dans la présente étude montre la capacité des films L-B de C₂₀ de servir comme une bonne surface de support.

4.3.2. Étude de la structure du cyt *f* incorporé dans une monocouche lipidique de DGDG

4.3.2.1. Propriétés interfaciales du DGDG et du mélange DGDG/cyt *f*

L'état physique du film lipidique est l'un des paramètres qui affectent l'incorporation de la protéine. Dans cette section, nous nous proposons d'étudier l'effet de DGDG sur l'interaction, l'organisation, ainsi que l'état d'agrégation du cyt *f* avec ce lipide en comparaison avec son partenaire, le MGDG. Les isothermes Π -A de DGDG et du mélange DGDG/cyt *f* sont représentés dans la figure 45. Chaque courbe est la moyenne de quatre expériences dont l'écart entre les extrêmes est de 2 Å²/molécule pour le DGDG et de 4 Å²/molécule pour le mélange DGDG/cyt *f*. Dans le cas du DGDG pur, la pression de départ est détectée à partir d'une aire moléculaire minimale égale à 130 Å²/molécule. Les valeurs au collapse sont de 42 mN/m et 48 Å²/molécule pour la pression de surface et l'aire moléculaire respectivement. Le DGDG ne diffère pas beaucoup du MGDG, les chaînes de ces deux lipides possèdent la même structure, elles forment une monocouche expansée très stable et donnent sur la même sous-phase des isothermes Π -A très rapprochées. L'incorporation du cyt *f* dans la monocouche lipidique du DGDG est réalisée dans des conditions semblables à celles du

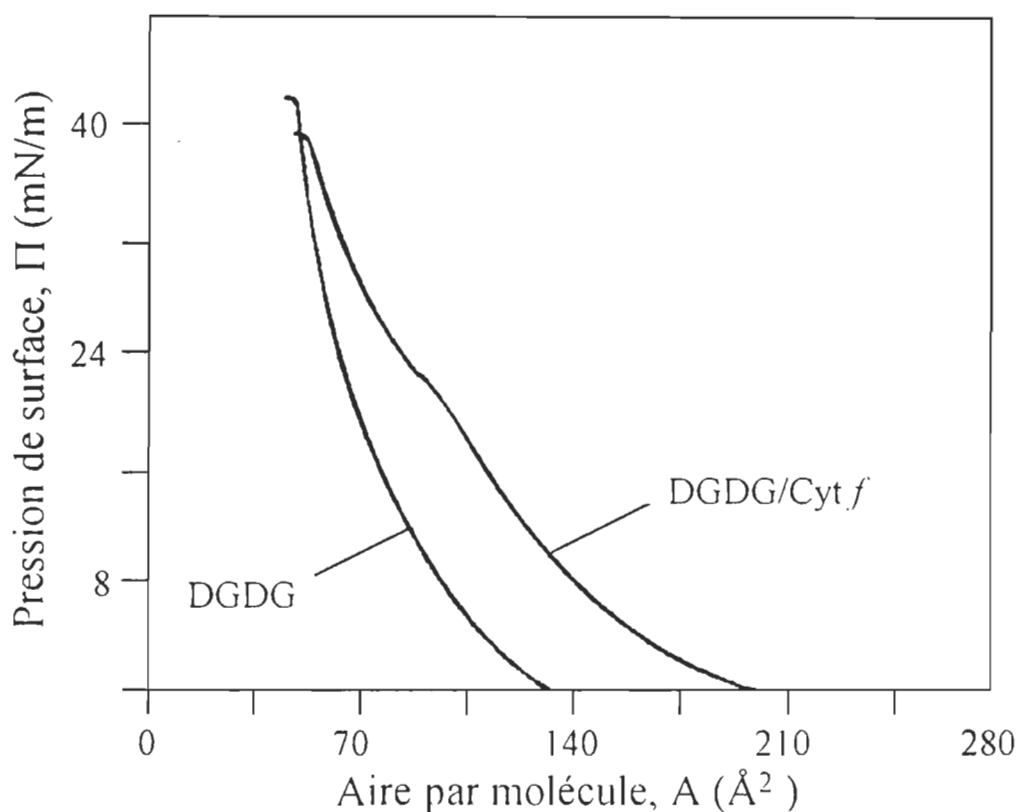


Figure 45. Isotherme Π - A du DGDG et du mélange DGDG/cyt f . La monocouche de DGDG est préparée à partir d'une solution constituée de chloroforme:méthanol (9:1, v:v) à une concentration de 0.25 mg/ml. Le cyt f est incorporé à la monocouche lipidique par épandage d'une solution préparée à 20% d'éthanol, la fraction molaire de cyt f est de 5%. La vitesse de compression est de 4 \AA^2 molécule $^{-1}$ s $^{-1}$. Sous-phase: Tris-HCl 1 mM, pH: 8.

MGDG. Le transfert de la monocouche mixte est effectué à 26 mN/m sur l'Au(111). L'isotherme du mélange DGDG/cyt *f* présentée dans la figure 45 montre deux collapsés situés à 22 et à 39 ± 1 mN/m. L'existence de ces deux collapsés dans le film mixte est attribuée à la non miscibilité des constituants dans le mélange (Gaines, 1966; Fidelio *et al.*, 1987). Dans la présente étude, le comportement observé dans le cas du mélange DGDG/cyt *f* est similaire à celui du système MGDG/cyt *f* discuté précédemment (section 4.3.1.1).

4.3.2.2. Visualisation par STM du mélange DGDG/cyt *f* en film L-B

La figure 46 montre la structure du film L-B du mélange DGDG/cyt *f* déposé sur l'Au(111) à 26 mN/m. Dans cette étude, l'enregistrement des images STM est effectué à l'air et en mode courant constant ($I_t = 0.1$ nA). La tension électrique (V_b) appliquée entre la pointe tunnel et l'échantillon est égale à -100 mV. L'image 46.a ($S_r = 2$ Hz, $S_z = 2$ μ m, $Z_r = 26$ nm) montre la topographie de la surface du film sur une large échelle. Cette image présente la surface de l'Au(111) couverte par des petits domaines ayant une forme circulaire et distribués uniformément au-dessus de la surface de l'Au(111). Elle montre également la formation de fissures dans la structure du film lipidique. Ces derniers sont reproductibles sur l'ensemble de la surface d'Au(111). La présence de fissures montre clairement l'existence du film lipidique au-dessus de la surface d'Au(111) provoquée par la forte adhésion du DGDG au substrat. Il est fort possible que la raison de la formation

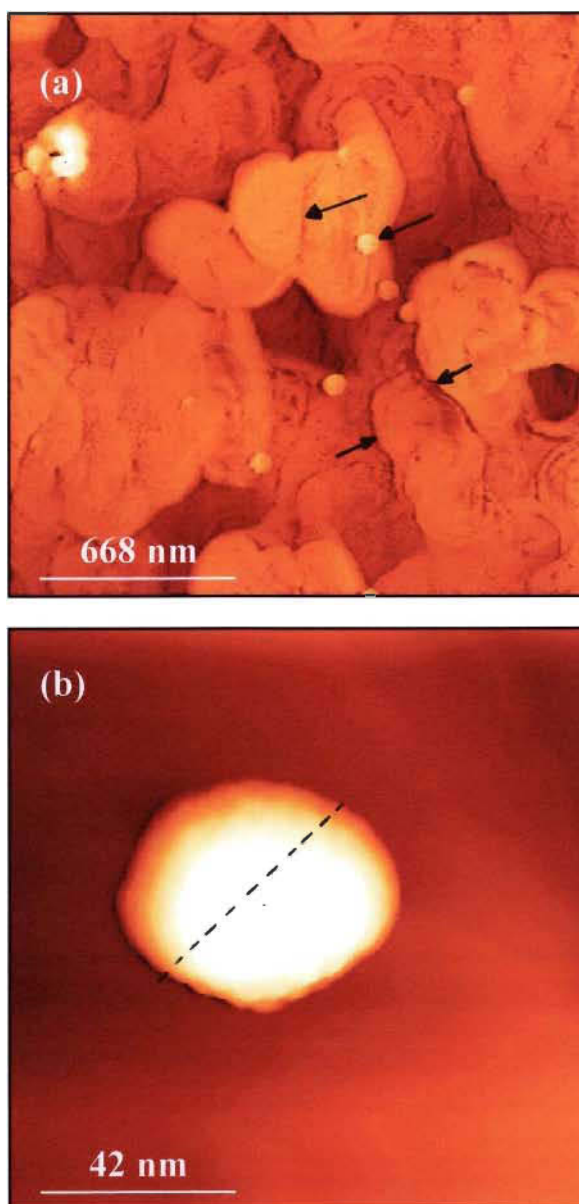


Figure 46. (a): Image STM de la topographie du mélange DGDG/cyt *f* en film L-B déposé sur l'Au(111). (b): morphologie d'un seul domaine formé dans le mélange DGDG/cyt *f*. Les tailles des images (a) et (b) sont égales à $2 \times 2 \mu\text{m}$ et $125 \times 125 \text{ nm}$, respectivement (voir détails dans le texte).

de fissures soit due à la présence de défauts dans la structure du film lipidique, causée par la rugosité de la surface d'Au(111). L'image 46.b ($I_t=0.1$ nA, $V_b=-50$ mV) représente la morphologie d'un seul domaine formé dans le mélange DGDG/cyt f ($S_r=2$ Hz, $S_z=125$ nm, $Z_r=34$ nm). Cette image montre, avec une meilleure résolution, que les domaines circulaires observés dans l'image 46.a possèdent une forme de sphère rugueuse.

L'examen du profil (figure 47) de la ligne discontinue, tracée sur la surface de la sphère visualisée dans l'image 46.b, indique que la hauteur moyenne du domaine sphérique peut facilement atteindre 29.2 ± 0.2 nm. De plus, ce domaine possède, à cet endroit, un diamètre de l'ordre de 57 ± 1 nm.

La figure 48 présente une vue en trois dimensions de la sphère rugueuse observée dans l'image 46.b. La rotation de celle-ci, de 135° par rapport à l'axe des Z et de 75° autour de l'axe des X, permet de déterminer la géométrie exacte de cette sphère sur la surface de l'Au(111). Contrairement à la forme sphérique observée dans l'image précédente, la vue en trois dimensions montre clairement l'apparition d'un agrégat de cyt f en forme de cône tronqué.

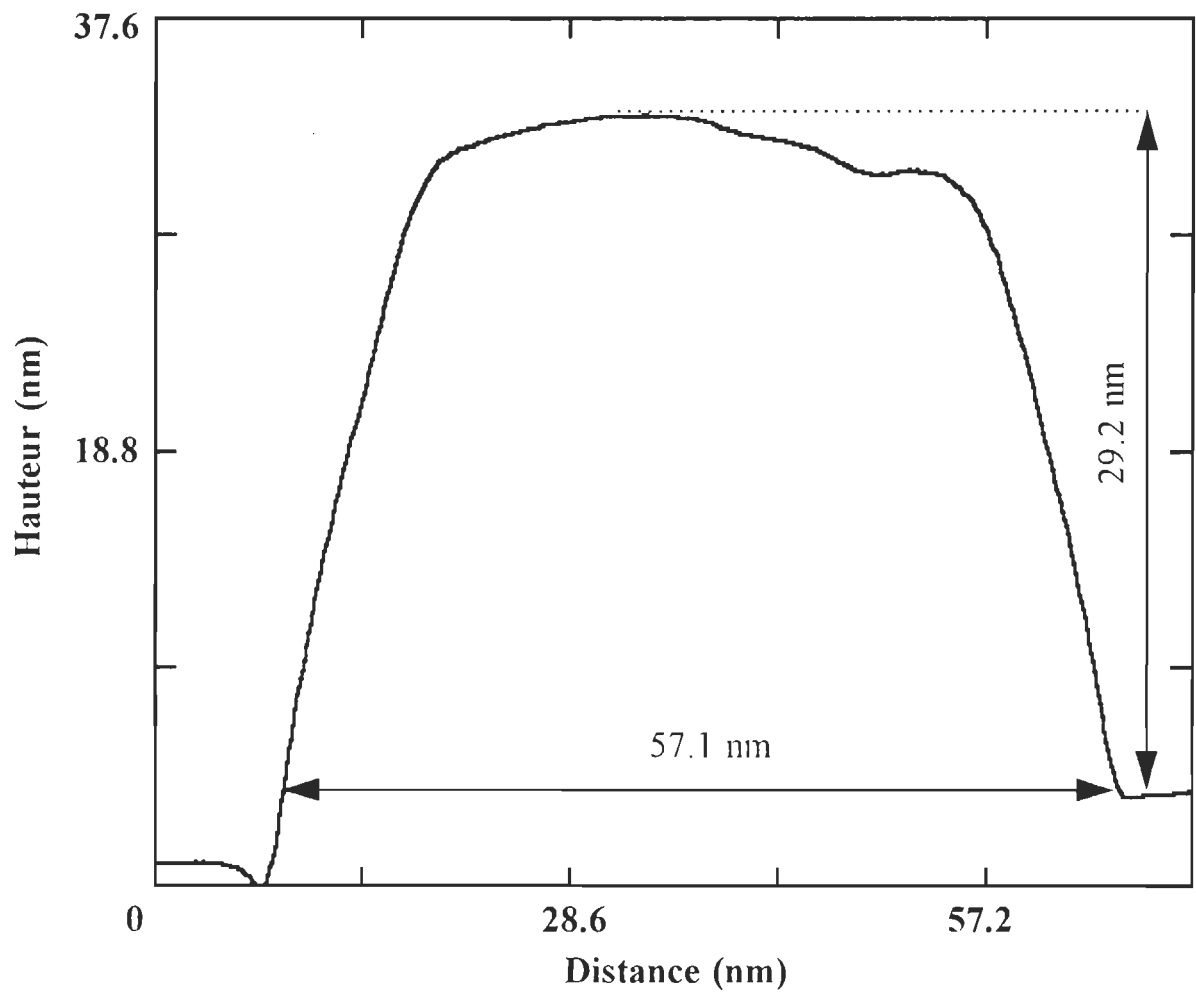


Figure 47. Courbe de profil de la sphère rugueuse. La ligne discontinue tracée dans l'image 46.b correspond au tracé de ce profil.

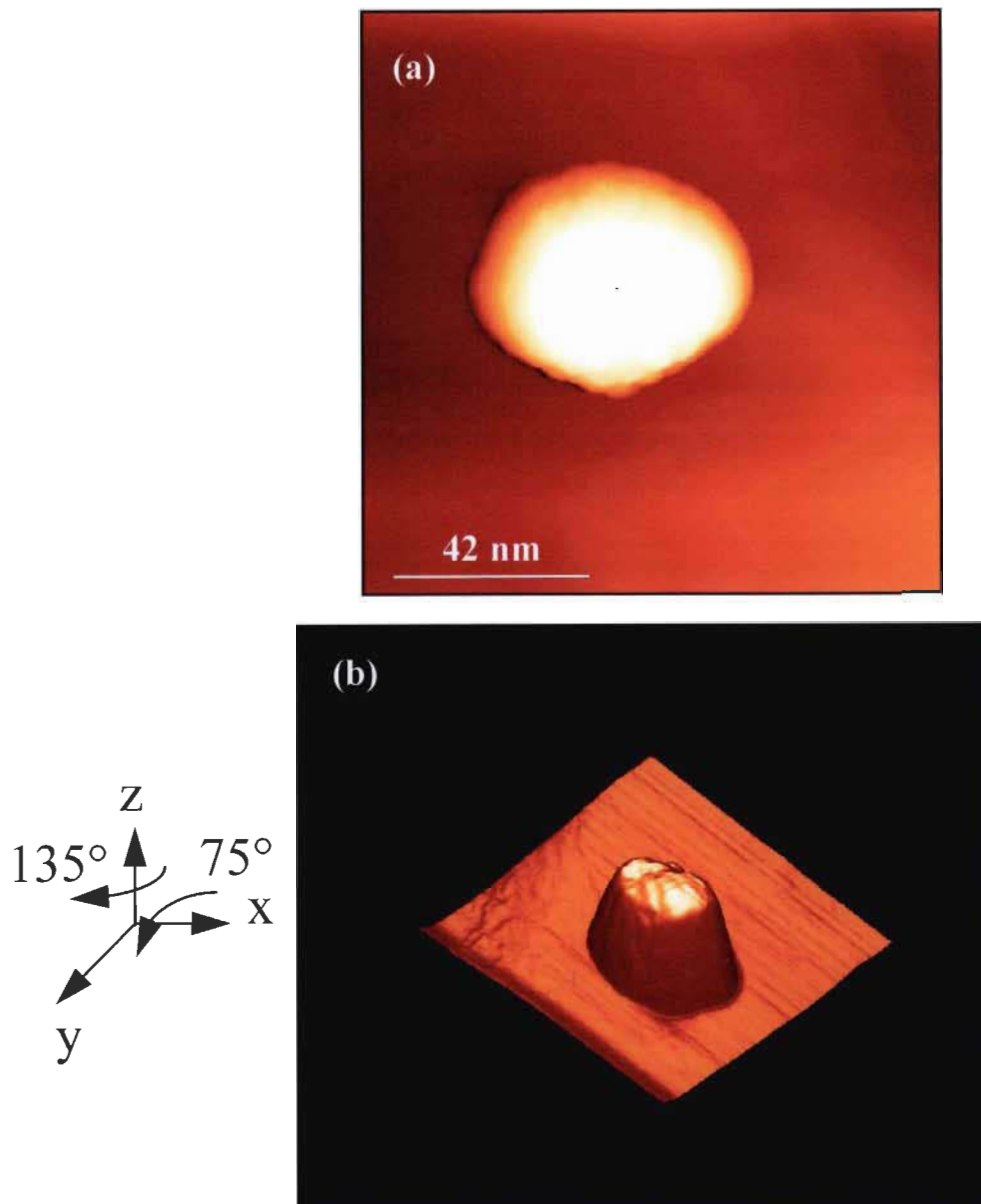


Figure 48. (b) Vue en trois dimensions de la sphère rugueuse observée dans l'image (a) de la figure 46, présentée en haut.

4.3.2.3. Visualisation par STM des particules de cyt f à une échelle moléculaire

L'image 49.a ($S_r=5.5$ Hz, $S_z=14$ nm, $Z_r=2$ nm) montre, avec une meilleure résolution, une vue rapprochée de la surface supérieure du cône tronqué. Cette image est obtenue en effectuant un balayage au-dessus de la surface du cône tronqué avec un agrandissement de 9 fois l'image 46.b. En considérant la dimension de cette image, il est facile de reconnaître les particules individuelles de cyt f . Ces dernières apparaissent comme des bosses ayant une forme globulaire au-dessus de la surface. La figure 49.b présente une vue en trois dimensions des particules de cyt f observées dans l'image 49.a. Cette image montre la distribution des particules de cyt f au-dessus de la surface du cône. La différence de contraste, entre les images 49.a et 49.b montre clairement l'emplacement des particules globulaires de cyt f au-dessus de la surface du cône.

La figure 50 présente le profil des particules de cyt f . La ligne discontinue, montrée à la surface des particules observées dans l'image 49.a, correspond au tracé de la courbe du profil. La valeur moyenne du diamètre et de la hauteur des particules de cyt f déterminées à partir de cette courbe sont de l'ordre de 3 et 0.2 nm respectivement. L'aire moléculaire moyenne d'une particule de cyt f estimée à partir de ces mesures est de l'ordre de 7 nm². La distance moyenne de séparation entre les deux proches sommets des particules est de l'ordre de 3.5 nm. Cette valeur est approximativement du même ordre de grandeur que le diamètre d'une

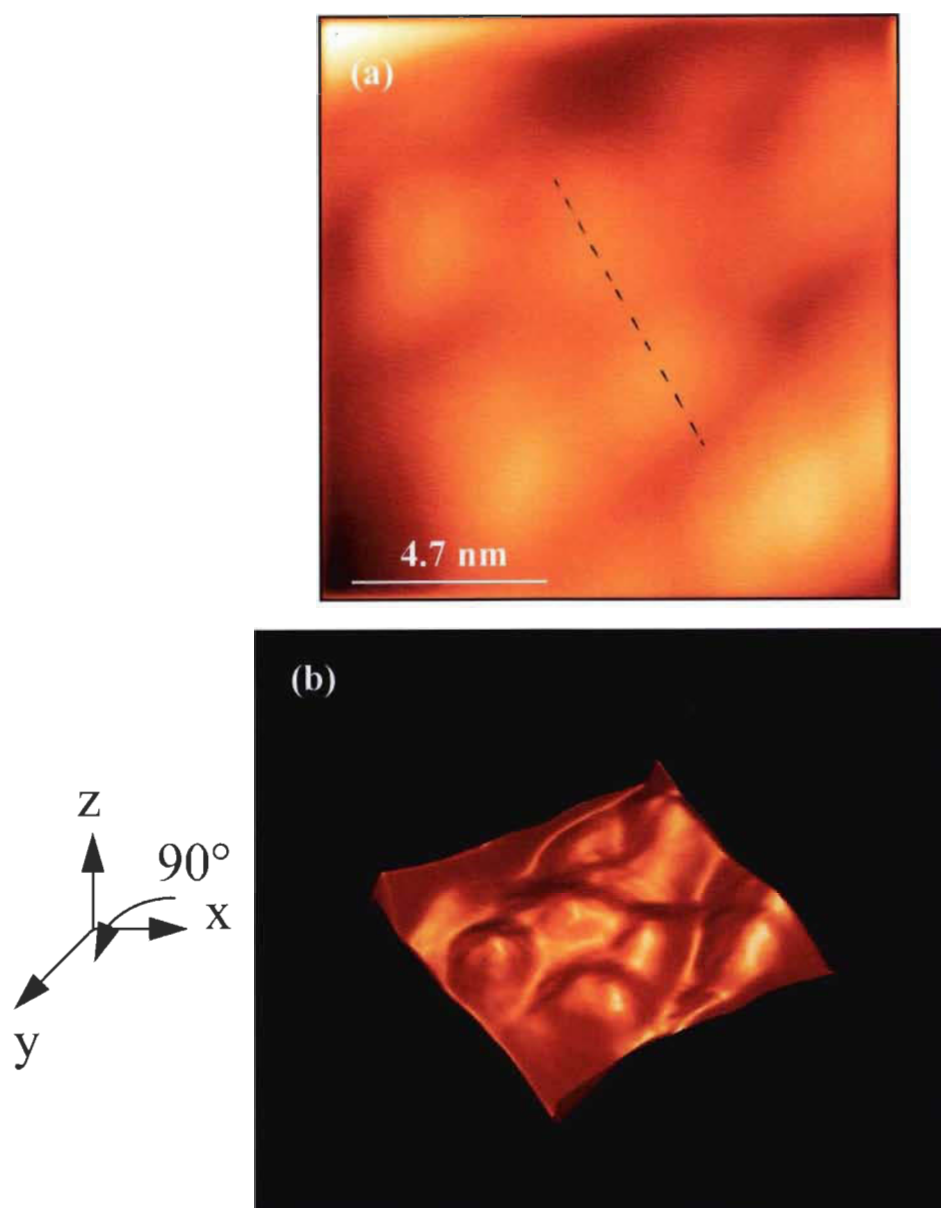


Figure 49. (a): Image STM des particules de cyt *f* à une échelle moléculaire. La taille de l'image est de 14 x 14 nm. (b): Vue en trois dimensions des particules de cyt *f*.

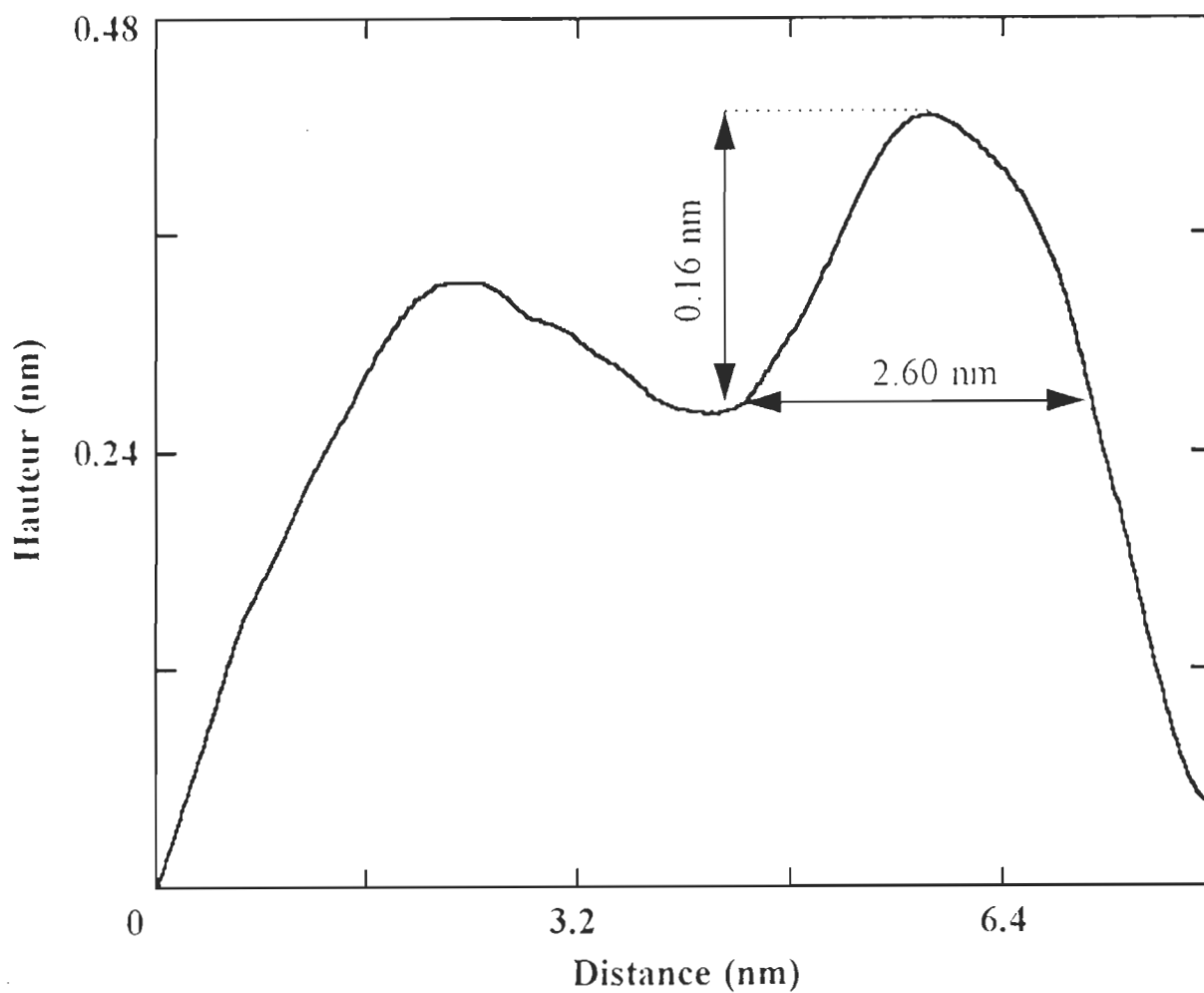


Figure 50. Courbe de profil des particules de cyt *f*. La ligne discontinue tracée dans l'image 49.a correspond au tracé de ce profil.

particule de cyt f . Notons que la hauteur des particules déterminée dans ce cas est en accord avec celle obtenue à partir de l'image STM du mélange MGDG/cyt f (image 38.b). Soulignons aussi que la différence de hauteur notée entre deux proches sommets de la courbe du profil (figure 50) peut être due à la rugosité de la surface de l'Au(111). Les agrégats de cyt f formés dans la monocouche mixte de DGDG/cyt f sont causés par une forte interaction entre les molécules de cyt f à l'interface air/eau. La topographie des films L-B du mélange DGDG/cyt f déterminée dans la présente étude montre que les deux constituants forment des phases séparées. Ces résultats confirment la non miscibilité des constituants à l'interface air/eau, discutée dans la section 4.3.2.1. L'agrégation excessive du cyt f dans le système mixte rend difficile la comparaison de ce modèle avec la membrane biologique. Ce travail est sous-pressé dans *Journal of Colloid and Interface Science* (Tazi *et al.*, 1996).

4.3.3. Conclusion

À la lumière des discussions présentées ci-dessus, on peut conclure que le MGDG et le DGDG forment des monocouches stables à l'interface air/eau. Par ailleurs, en mélange avec le cyt f , ces derniers donnent des monocouches non miscibles. De plus, ils sont capables de soutenir des pressions latérales (20 à 30 mN/m) comparables à celles rapportées pour les membranes biologiques (Birdi, 1989; Fidelio *et al.*, 1986).

L'incorporation du cyt *f* dans la monocouche lipidique de MGDG ou de DGDG montre que la protéine forme des agrégats de formes spécifiques. Les images STM du mélange MGDG/cyt *f* en films L-B montrent que les agrégats de cyt *f*, observés dans la structure des films, possèdent une forme conique alors que dans le mélange DGDG/cyt *f*, les agrégats prennent la forme de cône tronqué. Ces deux formes d'agrégats peuvent être la conséquence d'un dépliement résultant du changement conformationnel du cyt *f*.

L'étude des deux systèmes mixtes, MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f*, nous a permis d'obtenir des images de haute résolution qui décrivent bien la forme globulaire du cyt *f*. Les aires moléculaires déterminées à partir des images STM sont respectivement égales à 19.6 et 7.0 nm². Les dimensions du cyt *f* déterminées dans la présente étude montre que la structure conformationnelle du cyt *f* dépend grandement de son milieu environnemental biologique, dans notre cas le MGDG et le DGDG. La différence entre l'aire moléculaire estimée à partir des isothermes Π -A (13 nm²), obtenus à 20% d'éthanol et celle calculée à partir des images STM (19.6 nm² dans le cas du MGDG/cyt *f* et 7.0 nm² dans le cas du DGDG/cyt *f*) peut être attribuée à un changement dans la conformation de la protéine, à l'effet du substrat et de la pointe. Ainsi, il est très difficile de comparer les aires moléculaires déterminées par STM avec celles de la protéine à l'interface air/eau.

Dans le cas du mélange MGDG/cyt *f* déposé sur le mica modifié (mica/C₂₀), les images AFM montrent la capacité des films L-B

de C₂₀ de servir comme une bonne surface de support. Notons que l'épaisseur de la bicouche lipidique de MGDG déterminée par AFM est en bon accord avec celle rapportée dans la littérature (Marra, 1985).

CHAPITRE 5

CONCLUSION

À la lumière des résultats présentés dans le cadre des propriétés interfaciales du cyt *f*, on peut conclure que l'organisation et la stabilité de cette protéine à l'interface air/eau dépend essentiellement de la nature de ses constituants et de son interaction avec son environnement biologique. Les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* sont hautement influencées par la concentration interfaciale. Cependant, il existe une concentration critique de l'ordre de 0.5 mg/m², au-dessus de laquelle une partie des molécules initialement déposées sont solubilisées dans la sous-phase.

L'instabilité des isothermes Π -A et ΔV -A, en fonction de la concentration d'éthanol et du pH de la sous-phase, est un signe de l'apparition de changements conformationnels du cyt *f* à l'interface air/eau. L'augmentation progressive et simultanée des isothermes Π -A, vers de grandes aires moléculaires, est la preuve d'une plus grande rétention du cyt *f* à l'interface air/eau. Les fortes concentrations d'éthanol, supérieures à 20%, affectent largement la structure conformationnelle de la protéine, provoquant ainsi sa dénaturation à l'interface air/eau.

L'utilisation de la microscopie SPM (STM et AFM) a permis la détermination de la structure topographique réelle des films L-B de cyt *f* et des mélanges MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f*. Dans le cas des films préparés à 20% d'éthanol, les images AFM du cyt *f* déposé sur le mica montrent une structure agrégée. La faible différence de taille entre les agrégats formés à 5, 10 et 15 mN/m suggère que l'agrégation de la protéine prend place à l'interface air/eau. La structure des films préparés à 80% d'éthanol diffère de celle déterminée à 20%. En effet, à faible concentration d'éthanol, la taille des agrégats est de l'ordre de 50 nm. Cependant, à 80% d'éthanol, les agrégats forment des domaines ayant une largeur de l'ordre de 100 nm.

Dans le cas des films de cyt *f* déposés sur l'Au(111)/C₂₀, la dimension moyenne des agrégats déterminés par STM varie entre 200 et 400 nm. Comparés aux agrégats (~50 nm) visualisés par AFM, ceux observés par STM sont largement plus grands. La différence de taille entre les agrégats observés dans les images AFM et STM est due à l'effet du substrat utilisé, de l'épaisseur du film ainsi qu'à la forme et les dimensions de la pointe. La structure topographique des films L-B de cyt *f* déterminée par SPM, en fonction de la concentration d'éthanol et de la pression, est une preuve directe des changements observés dans les isothermes Π -A et ΔV -A du cyt *f* étalé à l'interface air/eau.

Les résultats présentés dans le cadre de l'interaction lipide-protéine ont montré que le MGDG et le DGDG forment des

monocouches stables à l'interface air/eau. En outre, en mélange avec le cyt *f*, ces derniers donnent des monocouches non miscibles. Malgré cette non miscibilité, les constituants en mélange sont capables de soutenir une pression de surface de 26 mN/m, comparable à celle rapportée pour les membranes biologiques, soit 20 à 30 mN/m. Ces résultats nous portent à croire que le MGDG et le DGDG sont pris en "sandwich" dans le coeur de la bicouche lipidique de la membrane thylacoïdienne. Les images STM du mélange MGDG/cyt *f* montrent que les agrégats de cyt *f* ont une forme conique alors que dans le mélange DGDG/cyt *f*, les agrégats prennent la forme de cône tronqué. La différence observée dans la forme des structures agrégées déterminées par STM est due à l'effet du substrat utilisé et à la forme et les dimensions de la pointe STM. L'étude des systèmes mixtes, MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f*, nous a permis d'obtenir des images de haute résolution qui décrivent bien la forme globulaire d'un agrégat de cyt *f*. Les aires moléculaires du cyt *f* déterminées à partir des images STM sont respectivement égales à 19.6 et 7 nm². Dans le cas du mélange MGDG/cyt *f* déposé sur le mica modifié (mica/C₂₀), l'épaisseur de la bicouche lipidique de MGDG déterminée par AFM est en bon accord avec celle rapportée dans la littérature (Marra, 1985). La topographie des films L-B du mélange MGDG/cyt *f* et DGDG/cyt *f* visualisée par STM et AFM montre que les deux constituants forment des phases séparées. Ces résultats confirment la non miscibilité des constituants à l'interface air/eau.

RÉFÉRENCES

- Adam Z. et Malkin R., . On the interaction between cytochrome f and plastocyanin, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1989, 975, 158-163.
- Allred D. R. et Staehelin L. A., Implication of cytochrome B6/f location for thylakoid electron transport, *J. Bioenergetics Biomembranes*, 1986, 18, 419-436.
- Almog R., Marsilio F. et Berns D., Interaction of C-phyococyanin with lipid monolayers under nitrogen and in the presence of air, *Arch. Biochem. Biophys.* 1988, 260, 28-36.
- Alt J. et Herrmann R. G., Nucleotide-sequence of the gene for pre-apocytochrome-f in spinach plastid chromosome, *Cur. Genet.* 1984, 8, 551-557.
- Barraud A., La technique de Langmuir-Blodgett: un outil pour l'ingénierie supramoléculaire en film mince, *Journal de chimie physique*, 1987, 84, 1106-1111.
- Barth J. V., Burne H., Ertl G. et Behm R. J., Scanning tunneling microscopy observations on the reconstructed Au(111) surface: Atomic structure, long-range superstructure, rotational domains, and surface defects, *Phys. Rev. B*, 1990, 42, 9307-9318.

- Bednarz J., Radunz A. et Schmid G. H., In Biological Role of Plant lipids, (Biacs, P.A., Gruiz, K. et Kremmer, T., ed.), Plenum, New York, 1989, 215-218.
- Binning G. et Rohrer H., Scanning tunneling microscopy, *Helv. Phys. Acta.*, 1982, 55, 726-735.
- Binning G., Quate, C. F. et Gerber C., Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, 1986, 56, 930-932.
- Birdi K. S. et Vu D. T., Structure of collapsed lipid monolayers investigated as Langmuir-Blodgett films by atomic force microscopy, *Langmuir*, 1994, 10, 623-625.
- Birdi K. S., Lipid and Biopolymer Monolayers at liquid interfaces, *Plenum Press, New York.*, 1989, 325-337.
- Bishop D. G. et Kenrick J. R., Biogenesis and Function of Plant Lipids (Mazliak, P.; Benveniste, P.; Costes, C. and Douce, R. eds)., 1980, 415-420.
- Bishop D. G., Kenrick J. R., Bayston J. H., Macpherson A. S. et Johns S. R., Monolayer properties of chloroplast lipids, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1980, 602, 248-259.
- Boland J. J., Structure of the H-saturated Si(111) surface, *Phys. Rev. Lett.*, 1990, 65, 3325-3328.

- Bourque H. et Leblanc R. M., Electrochemical fabrication of scanning tunneling microscopy tips without an electronic shut-off control, *Rev. Sci. Instrum.*, 1995, 66, 1-3.
- Braunstein D., Imaging an *F*-actin structure with noncontact scanning force microscopy, *J. Vac. Sci. Technol.*, 1995, A13, 1733-1736.
- Brecht E., The light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex II of higher plants: results from a twenty-year research period, *Photochem. Photobiol.*, 1986, 12, 37-50.
- Brousseau J. L., Tian K., Gauvin S., Leblanc R. M. et Delhaès P., Interfacial and vibrational properties of thin films of C₆₀, *Chem. Phys. Lett.*, 1993, 202, 521-527.
- Brown N. M. et You H. X., A preliminary scanning tunneling microscopy study of the surface-organized structures of Gramicidin S hydrochloride on oriented pyrolytic graphite, *J. Struc. Biol.*, 1991., 107, 250-258.
- Burnham N. A., Colton R. J. et Pollock H. M., Interpretation of force curves in force microscopy, *Nanotechnology*, 1993, 4, 64-80.
- Butt H. J., Prater C. B. et Hansma P. K., Imaging purple membranes dry and in water with the atomic force microscope, *J. Vac. Sci. & Technol.*, 1991, 9, 1193-1196.

- Chin P. et Brody S. S., Mixed monomolecular films of chlorophyll and cytochromes, *Z. Naturforsch.*, 1976, 31C, 44-47.
- Chin P. et Brody S. S., Surface properties of monolecular films of oxydized and reduced cytochrome c and f., *Biochem*, 1975, 14, 1190-1193.
- Cramer W. A. et Whitmarsh J., Photosynthetic cytochromes, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1977, 28, 133-172.
- Cramer W. A., Furbacher P. N., Szczepaniak A. et Tae G. S., Electron transport between photosystem II and photosystem I, In Current Topics in Bioenergetics. (Lee, C.P., ed). Academic Press, San Diego. 1991, 179-222.
- Danielli J. F. et Davson H., A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1935, 5, 495-508.
- Davenport H. E., Some observation on cytochrome f, Reprint from IIInd International Congress on photosynthesis, 1971, 1593-1601.
- Davies R. J., Goodwin G. C., Lyle I. G. et Jones M. N., The interaction of glycophorin with dipalmitoylphosphatidylcholine at the air-water interface, *Colloid & Surfaces*, 1984 , 8, 261-270.

- Davies R. J., Goodwin G. C., Lyle I. G., et Jones M. N., The behaviour of glycophorin at the air-water interface. *Colloid & Surfaces*, 1983, 8, 29-43.
- Demel R. A., Schiavo G., de Kruijff B. et Montecucco C., Lipid interaction of diphtheria toxin and mutants. A study with phospholipid and protein monolayers, *Eur. J. Biochem.*, 1991, 197, 481-486.
- DeRose J. A. et Leblanc R. M., Scanning tunneling and atomic force microscopy studies of Langmuir-Blodgett films, *Surf. Sci. Rep.*, 1995, 22, 75-136.
- DeRose J. A., Thundat T., Nagahara L. A. et Lindsay S. M., Gold grown epitaxially on mica-conditions for large area flat faces, *Surf. Sci.*, 1991, 256, 102-108.
- DeRose, J. A Lampner, D. B.; Lindsay, S. M. and Tao N. J., Comparative scanning probe microscopy study of the surface morphology of gold films grown from the vapor onto glass fused silica and muscovite mica, *J. Vac. Sci. Technol. A.*, 1993, 11, 776-780.
- Drake B., Prater C. B., Weisenhorn A. L., Gould S. A. C., Albrecht T. R., Quate C. F., Cannell D. S., Hansma H. G. et Hansma P. K., Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope, *Science.*, 1989, 243, 1586-1589.

Driscoll R. J., Youngquist M. G. et Baldeschwieler J. D., Atomic-scale imaging of DNA using scanning tunneling microscopy, *Nature.*, 1990, 346, 294-296.

Edstom R. D., Meinke M. H., Yang X., Yang R. et Evans F. D., Direct observation of phosphorylase kinase and phosphorylase b by scanning tunneling microscopy, *Biochemistry.*, 1989, 28, 4939-4942.

Es-Sounni A., Interaction lipide-lipide et lipide-protéine dans le modèle de monocouche à l'interface air/eau, Thèse de doctorat présentée à l'Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada, 1993.

Fare T. L., Palmer C. A., Silvestre C. G., Cribbs D. H., Turner D. C., Brandow S.L. et Gaber B.P., Langmuir-Blodgett studies and atomic force microscope images of nicotinic acetylcholine receptor films, *Langmuir.*, 1992, 8, 3116-3121.

Feenstra R. M., Band gap of the Ge(111)-2x1, and Si(111)-2x1 surfaces by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. B.*, 1991, 44, 13791-13794.

Feenstra R. M., Slavin A. J., Held G. A. et Lutz M. A., Surface diffusion and phase transition on the Ge(111) surface studied by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, 1991, 66, 3257-3260.

Fidelio G. D., Austen B. M., Chapman D. et Lucy J. A., Interactions of ovalbumin and its putative signal sequence with phospholipid monolayers, *Biochem. J.*, 1987, 244, 295- 301.

Fidelio G. D., Maggio B. et Cumar F. A., Interaction of melittin with glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers at different temperatures. Effect of the lipid physical state, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1986, 862, 49-56.

Fisher K. A., Witfield S. L., Thomson R. E., Yanagimoto K. C., Gustafsson M. G. L. et Clarke J., Measuring changes in membrane thickness by scanning tunneling microscopy, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, 1023, 325-334.

Fragata M., Norden B. et Kurucsev T., Linear dichroism (250-700) of chlorophyll a and pheophytin a oriented in a lamellar phase of glycerylmonooctanoate/H₂O. Characterization of electronic transition, *Photochem. Photobiol.*, 1988, 47, 133-143.

Fuchs H., Chi L. F., Eng L. M. et Graf K., Defects structures of Langmuir-Blodgett films investigated by scanning force microscopy, *Thin Solid Films.*, 1992, 210, 655-658.

Fujiwara I., Ohnishi M. et Seto J., Atomic force microscopy study of protein-incorporating Langmuir-Blodgett films, *Langmuir.*, 1992, 8, 2219-2222.

Gaines G. L., Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. John Wiley and Sons, *Interscience*, New York. 1966, 386-405.

Gallant J., Purification des lipides du chloroplaste par chromatographie liquide à haute performance et études spectroscopiques de mélanges chlorophylle a/lipides à l'état monomoléculaire, Mémoire de maîtrise présentée à l'Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada, 1990.

Gennis R. B., Biomembranes. Molecular Structure and Function, Springer-Verlag, New York, 1989.

Golbeck J. H., Structure, Function and Organization of the Photosystem Reaction Center Complex, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1987, 895, 167-204.

Gorter E. et Grendel F., On biomolecular layers of lipid on the chromocytes of the blood, *J. Exp. Med.*, 1925, 41, 439-443.

Gounaris K. et Barber, J., Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature, *Trends in Biochem. Sci.*, 1983, 8, 378-381.

Govindjee et Govindjee R., Introduction to photosynthesis. Bioenergetics of photosynthesis. In Govindjee, Ed. Academic Press, New York, 1975, 1-50.

Graham D. E. et Phillips M. C., Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1979a, 70, 403-414.

Graham D. E. et Phillips M. C., Proteins at liquid interfaces.
II. Adsorption isotherms, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1979b,
70, 415-426.

Graham D. E. et Phillips M. C., Proteins at liquid interfaces.
III. Molecular structure of adsorbed films, *J. Colloid.
Interface. Sci.*, 1979c, 70, 427-439.

Gray J. C. Cytochrome f: Structure, function and biosynthesis.
Photosynth. Res., 1992, 34, 359-374.

Gray J. C., Purification and properties of monomeric cytochrome f
from charlock, *Sinapis arvensis* L. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 82,
133-141.

Guay D. et Leblanc R. M., Excess free energies of interaction of
chlorophyll a with α -tocopherylquinone and plastoquinone 3
and 9. A mixed-monolayer study, *Langmuir.*, 1987, 3,
575-580.

Guss J. M. et Freeman H. C., Structure of oxidized polar plastocyanin
at 1.6 angstrom resolution, *J. Mol. Biol.*, 1983., 169, 521-563.

Hamers R. J., Tromp R. M. et Demuth J. E., Electronic and geometric
structure of Si(111)-7x7 and Si(001) surfaces, *Surf. Sci.*,
1987, 181, 346-355.

Hansma H. G. et Hoh J. H., Biomolecular imaging with the atomic force microscope, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.*, 1994, 23, 115-139.

Hansma P. K., Elings V. B., Marti O. et Bracker C. E., Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology, *Science.*, 1988, 242, 209-216.

Hartmann U., Theory of van der Waals microscopy, *J. Vac. Sci. & Technol.*, 1991, B9, 465-469.

Heckl W. M., Smith D. P. E., Binnig G., Klagges H., Hansch T. W. et Maddocks J., Two-dimensional ordering of DNA base guanine observed by scanning tunneling microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 8003-8005.

Heckl W. M., Zaba B. N. et Möhwald H., Interactions of cytochromes b5 and c with phospholipid monolayers, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1987, 903, 166-176.

Henderson E., Haydon P. G. et Sakaguchi D. S., Actin filament dynamics in living Glial cells imaged by atomic force microscopy, *Science.*, 1992, 257, 1944-1946.

Herrington T. M. et Sahi S. S., Desorption of bovine serum albumin from the air-water interface, *Food Emulsions Foams*, 1987, 58, 188-206.

- Ho K. K. et Krogmann D. W., Cytochrome from spinach and cyanobacteria: Purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 3855-3861.
- Hoober J. K., Chloroplasts. New York: Plenum Press, 1984, 20-89.
- Horton P. et Cramer W. A., The accessibility of the chloroplast cytochrome f and b-559 to ferricyanide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 368, 348-360.
- Hoshina S. et Ithoh S., Characterization of photosystem I, Chlorophyll-protein complexes reconstituted into phosphatidylcholine liposomes, *Plant Cell Physiol.*, 1987, 28, 599-609.
- Hui S. W., Viswanathan R., Zasadzinski L. A. et Israelachvili J. N., The structure and stability of phospholipid bilayers by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, 1995, 68, 171-178.
- Hurt E. C. et Hauska G., A cytochrome f/b₆ complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxydoreductase activity from spinach chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, 1981, 117, 591-599.
- Isler O. In Isler O, ed. Carotenoids. Birkhauser Verlag Basel, 1971, 11-27.
- Joliot P. et Joliot, A., In Staehelin L. A. et Arntzen C. J, eds. Photosynthesis III. Photosynthetic Membranes and Light

Harvesting Systems, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. 1986, 19, 528-538.

Kaplan S. et Artzen C. J. Photosynthetic membrane structure and function. In Govindjee (Ed) Photosynthesis, Energy conversion by plants and bacteria, Academic Press, New York, 1982, 1, 65-151.

Kashiwagi M., Some remarks on the spreading of protein monolayers (Dynamic studies on monolayer. I), *Bull. Chem. Soc.*, 1958, 31, 176-80.

Kashiwagi M., surface films of physically and chemically treated ovalbumin (dynamic studies on monolayers II), *Chem. Soc. Jap.*, 1959, 31, 954-956.

Keller D. J. et Franke F. S., Envelope reconstruction of probe microscope images, *Surf. Sci.*, 1993, 294, 409-419.

Kézdy F. J., Lipid monolayers, In Fox C.F. et Keith A.D. (Eds) Membrane molecular biology, Associates Inc. Publishers Stamford, Conn. 1972, 123-45.

Krebs K. E., Ibdah J. A. et Phillips M. C., A compaison of the surface activities of human apolipoproteins A-II at the air/water interface, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, 959, 229-237.

Krinsky N. I., In Isler O. ed. Carotenoids. Birkhauser Verlag Basel, 1971, 621-716.

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 1970, 227, 680-685.

Lamarche F., Max, J.J. et Leblanc R. M., Weak and strong lipid-protein interactions characterized by the monolayer technique. In Ratner B. D. (Ed.) Surface characterization of biomaterials. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, Netherlands. 1988a, 117-133.

Lamarche F., Picard, G., Téchy, F., Aghion, J. et Leblanc, R. M., Complex formation between chlorophyll a and cytochrome c. Surface properties at the air-water interface. Absorbance, fluorescence and fluorescence lifetime in Langmuir-Blodgett films, *Eur. J. Biochemistry.*, 1990, 197, 529-534.

Lamarche F., Techy F., Aghion J. et Leblanc R. M., Surface pressure, surface potential and ellipsometric study of cytochrome c binding to dioleoylphosphatidylcoline monolayer at the air-water interface, *Colloids and Surfaces.*, 1988b, 30, 209-22.

Lamarche F., Une approche permettant de qualifier et quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau. Thèse de doctorat présentée à l'Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada, 1988.

Li G., Horvath L. I., Knowles P. F., Murphy D. J. et Marsh D., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1989, 987, 187-192.

- Lin J. N., Drake B., Lea A. S., Hansma P. K. et Andrade J. D., Direct observation of Immunoglobulin adsorption dynamics using the atomic force microscope, *Langmuir.*, 1990, 6, 509-511.
- MacRitchie F. et Ter-Minassian- Saraga L., Concentrated protein monolayers: desorption studies with radiolabelled bovine serum albumin, *Colloids & Surfaces.*, 1984, 10, 53-64.
- MacRitchie F., Desorption of proteins from the air/water interface, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1985, 105, 119-123.
- MacRitchie F., Equilibria between adsorbed and displaced segments of protein monolayers, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1981, 79, 461-464.
- MacRitchie F., Spread monolayers of proteins, *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 1986, 25, 341-385.
- Maget-Dana R., Harnois I. et Ptak M., Interactions of the lipopeptide antifungal iturin A with lipids in mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1989, 981, 309-314.
- Manne S., Butt H. J., Gould S. A. C. et Hansma P. K., Imaging metal atoms in air and water using the atomic force microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 1990, 56, 1758-1759.
- Mara J., Controlled deposition of lipid monolayers and bilayers onto mica and directed force measurements between galactolipid

bilayers in aqueous solutions, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1985, 107, 446-458.

Markiewicz P. et Goh C. M., Atomic force microscope tip deconvolution using calibration arrays, *Rev. Sci. Instrum.*, 1995, 66, 3186-3190.

Marti O., Drake B. et Hansma P. K., Atomic force microscopy of liquid surfaces: atomic resolution images, *Appl. Phys. Lett.*, 1987, 51, 484-486.

Martin Y., Williams C. C. et Wickramasinghe H. K., Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale, *J. Appl. Phys.*, 1987, 61, 4723-4729.

Martinez S. E., Smith J. L., Huang D., Szczepaniak A., Cramer W. A. et Smith J. L., Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation, *Structure.*, 1994, 2, 95-105.

Meyer G. et Amer N. A., Novel optical approach to atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 1988, 53, 1045-1047.

Monnier A. M. et Monnier A., Formation de membranes minces et stables par étalement de lipides non saturés sur des solutions oxydantes, *J. Physiol. Paris*, 1964, 56, 410-411.

Moore A. L., Joy A., Tom R., Gust D. et Moore T. A., Photoprotection by carotenoids during photosynthesis: Motional dependence of

intermolecular energy transfer, *Science.*, 1982, 216, 982-984.

Morris V. J., Biological applications of scanning probe microscopies, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 1994, 61, 131-185.

Murata N. et Miyao M., Photosystem II and oxygen evolution, In Photosynthesis (Briggs, W.R., ed.), New York: Aian R. Liss, Inc. 1989, 59-70.

Murphy D. J. et Woodrow I. E., The lateral segregation model. Biosynthesis and function of plant lipids. Edited by Thomson, Mudd and Gibbs. *Am. Soc. Plant Physiologists*, 1983, 104-125.

Murphy D. J. In Encyclopedia of Plant Physiology (Staehelin, L.A and Arntzen, C.J., eds.), 1986, 19, 713-725.

Murphy D. J. The molecular organization of the photosynthetic membranes of higer plants, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1986, 864, 33-94.

Niemi H. E. M., Ikonen M., Levlin J. M. et Lemmetyinen H., Bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films imaged with scanning tunneling microscope, *Langmuir.*, 1993, 9, 2436-2447.

Nishihara M., Yokota K. et Kito M., Lipid molecular species composition of the thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 617, 12-19.

- Ogletree F. et Salmeron M., Scanning tunneling microscopy and the atomic structure of solid surfaces, *Prog. Sol. Stat. Chem.*, 1990, 20, 235-303.
- Pezron E., Claesson P. M., Berg J. M. et Vollhardt D., Stability of arachidic acid monolayers on aqueous salt solutions, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1990, 138, 245-254.
- Ringsdorf H., Schlarb B. et Venzmer, J., Molecular architecture and function of polymeric oriented systems: Models for the study of organization, surface recognition, and dynamics of biomembranes. *Angew. Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 113-158.
- Rivas E. et Luzzati, V., Polymorphism of corn chloroplasts polar lipids and galactolipids in the presence of water, *J. Molec. Biol.*, 1969, 41, 261-275.
- Roberts C. J., Williams M. P., Davies M. C., Jackson D. E et Tendler S. J. B., Atomic force microscopy and scanning tunneling microscopy: refining techniques for studying biomolecules, *Trends in biotechnology.*, 1994, 12, 127-132.
- Robertson R. N., The lively membranes. Cambridge: Cambridge University Press, 1983, 38- 53.
- Rugar D. et Hansma P. K., Atomic force microscopy, *Physics Today*, 1990, 23-30.

Salmeron M., Folch A., Neubauer G., Tomitori M. et Ogletree D. F., Nanometer scale mechanical properties of Au(111) thin films, *Langmuir.*, 1992, 8, 2832-2842.

Schwartz D. K., Garnaes J., Viswanathan R. et Zasadzinski J. A. N., Surface order and stability of Langmuir-Blodgett films, *Science.*, 1992, 257, 508-511.

Siefermann-Harms D., Ninnemann H. et Yamamota H. Y., Reassembly of solubilized chlorophyll-protein complexes in proteolipid particles. Comparison of monogalactosyldiglycerol and two phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1987, 892, 303-313.

Singer S. J. et Nicholson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membrane, *Science.*, 1972, 175, 720-731.

Sugawara Y., Ishizaka T. et Morita S., Simultaneous imaging of graphite surface with atomic force/scanning tunneling microscope (AFM/STM), *J. Appl. Phys.*, 1990, 29, 1539-1543.

Tanocrède P., Chauvette G. et Leblanc R. M., General method for the purification of lipids for surface pressure studies. *J. Chromatogr.*, 1981, 207, 387-393.

Tanocrède P., Munger G. et Leblanc R. M., Excess free energies of interaction of chlorophyll a with monogalactosyldiacylglycerol and phytol. A mixed monolayer study, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1982, 689, 45-54.

- Taneva S., Panaiotov I. et Ter-Minassian-Saraga L., Effect of surface pressure on mixed dipalmitoylecithin-serum albumin monolayer composition, *Colloids & Surfaces.*, 1984, 10, 101-111.
- Tazi A., Boussaad S. et Leblanc R. M., Scanning probe microscopy of cytochrome *f* (Cyt*f*) and mixed monogalactosyldiacylglycerol (MGDG/Cyt*f*) Langmuir-Blodgett films, *Langmuir.*, 1996, soumis.
- Tazi A., Boussaad S. et Leblanc R. M., STM study of mixed Langmuir-Blodgett (L-B) films of digalactosyldiacylglycerol (DGDG) and cytochrome *f* (cyt *f*), *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1996, Soumis.
- Tazi A., Boussaad S., DeRose J. A. et Leblanc R. M., Structural investigation of cytochrome *f* Langmuir-Blodgett films with scanning tunneling microscopy: protein aggregation, *J. Vac. Sci. Technol. B.*, 1996, 14, 1-5.
- Tazi A., Hotchandani S., Munger G. et Leblanc R. M., Study of the conformational stability of cytochrome *f* at the air-water interface, *Thin Solid Films.*, 1994, 247, 240-243.
- Thornber J. P., Markwell J. P. et Reinman S., Plant chlorophyll-protein complexes: Recent advances. Photochem. *Photobiol.*, 1979, 29, 1205-1216.

- Thornber J. P., Peter, G. F. et Nechushtai R., Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants, *Physiol. Plantarum*, 1987, 71, 236-240.
- Trurnit H. J. A., A theory and method for the spreading of protein monolayers, *J Colloid Sci.*, 1960, 15, 1-13.
- Webb M. S. et Green B. R., Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1991, 1060, 133-158.
- Willey D. L., Auffret A. D. et Gray J. C., Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes, *Cell.*, 1984, 36, 555-562.
- Willms I., Malkin R. et Chain R. K., Studies of the chloroplast cytochrome *b6 -f* complex incorporated into liposomes, In Biggens J. (Ed). *Progress in Photosynthesis research.*, 1987, II, 466-468.
- Zasadzinski J. A., Scanning tunneling microscopy with applications to biological surfaces, *Biotechniques.*, 1989, 7, 174-187.
- Zasadzinski J. A., Viswanathan R., Madsen I., Garnaes J. et Schwartz D. K., Langmuir-Blodgett films, *Science.*, 1994, 263, 1726-1733.